



HAL
open science

Mise en place et évaluation des dosages sériques de
l'estradiol, de la progestérone et de l'hormone
lutéinisante sur l'analyseur Dimension Vista (Siemens) :
application aux dosages urinaires de l'estradiol et de
l'hormone lutéinisante chez la femme au cours de l'aide
médicale pour la procréation

Hadrien Maguet

► **To cite this version:**

Hadrien Maguet. Mise en place et évaluation des dosages sériques de l'estradiol, de la progestérone et de l'hormone lutéinisante sur l'analyseur Dimension Vista (Siemens) : application aux dosages urinaires de l'estradiol et de l'hormone lutéinisante chez la femme au cours de l'aide médicale pour la procréation. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01216528

HAL Id: dumas-01216528

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01216528v1>

Submitted on 16 Oct 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2015

N°

Mise en place et Evaluation des dosages sériques de l'estradiol, de la progestérone et de l'hormone lutéinisante sur l'analyseur Dimension Vista (Siemens).
Application aux dosages urinaires de l'estradiol et de l'hormone lutéinisante chez la femme au cours de l'aide médicale pour la procréation

MEMOIRE

DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE :
Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE

Présentée à la Faculté de Pharmacie de GRENOBLE

Et soutenue publiquement le : 9 Octobre 2015

Pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

Par : Hadrien MAGUET

Né (e) le : 3 Mars 1986

A Montpellier

JURY

MEMBRES :

Président : Monsieur le Professeur P.FAURE

Madame le Professeur P.HOFFMANN

Monsieur le Docteur F.LAPORTE (directeur de thèse)

Madame le Docteur D.GUERGOUR.

La faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Christophe RIBUOT**Vice-doyen et Directrice des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2014-2015

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

STATUT	NOM	PRENOM	DEPARTEMENT**	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	D4	LAPM UMR SNRS 5163
PU-PH	ALLENET	Benoit	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
PU	BAKRI	Aziz	D5	TIMC-IMAG
MCU	BATANDIER	Cécile	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU-PH	BEDOUCHE	Pierrick	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	BELLET	Béatrice	D5	-
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	BOURGOIN	Sandrine	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
MCU	BRETON	Jean	D1	L.C.I.B. - UMR E3 CEA/UJF
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	Anne	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	D4	IBS
PU	BURMEISTER	Wim	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoit	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
Professeur Emérite	CALOP	Jean	D5	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	D1	LAPM
MCU	CHOISNARD	Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU-PH	CORNET	Murielle	D4	THEREX, TIMC-IMAG
PU-PH	DANEL	Vincent	D5	SMUR SAMU
PU	DECOUT	Jean-Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	DELETRAZ-DELPORTE	Martine	D5	Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128) UCB

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER. Lantou.Faure@ujf-grenoble.fr



MCU	DEMEILLIERS	Christine	D1	LBFA, Inserm U1055
PU	DROUET	Christian	D4	AGIM - CNRS 3405
PU	DROUET	Emmanuel	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	DURMORT-MEUNIER	Claire	D1	I.B.S
PU-PH	FAURE	Patrice	D1	HP2-Inserm U1042
PRCE	FITE	Andrée	D6	-
PRAG	GAUCHARD	Pierre-Alexis	D3	-
MCU-PH	GERMI	Raphaëlle	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	GEZE	Annabelle	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GILLY	Catherine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	GODIN-RIBUOT	Diane	D5	HP2-Inserm U1042
PRCE	GOUBIER MATHYS	Laurence	D6	-
Professeure Emérite	GRILLOT	Renée	D4	-
MCU	GROSSET	Catherine	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GUIEU	Valérie	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	HININGER-FAVIER	Isabelle	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU	JOYEUX-FAURE	Marie	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	KHALEF	Nawel	D5	TIMC-IMAG
MCU	KRIVOBOK	Serge	D3	IRTSV
PU	LENORMAND	Jean Luc	D1	THEREX, TIMC-IMAG
PU	MARTIN	Donald	D1	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF-CNRS
MCU	MELO DE LIMA	Christelle	D4	L.E.C.A
PU-PH	MOSSUZ	Pascal	D4	THEREX, TIMC-IMAG
MCU	MOUHAMADOU	Bello	D3	L.E.C.A
MCU	NICOLLE	Edwige	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	OUKACINE	Farid	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PERES	Basile	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PEUCHMAUR	Marine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	PEYRIN	Éric	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	RACHIDI	Walid	D1	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER.

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER. Lantou.Faure@ujf-grenoble.fr



MCU	RAVELET	Corinne	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	RIBUOT	Christophe	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	RIEU	Isabelle	D5	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	Anne -Marie	D1	-
PU-PH	SEVE	Michel	D1	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	SOUARD	Florence	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	TARBOURIECH	Nicolas	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
PAST	TROULLER	Patrice	D5	-
MCU	VANHAVERBEKE	Cécile	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	WOUESSIDJEW	Denis	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063

** D1 : Département « Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements (DMBMT) »

D2 : Département « Bases Physicochimiques du Médicament »

D3 : Département « Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments » (O3-PAM)

D4 : Département « Bases immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et Médicaments associés »

D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »

D6 : Département « Anglais »

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
CRI : Centre de Recherche Institut
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
et de Cognition et Ontogénèse »
HP2 : Hypertension Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogénèse
IPB :
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roger
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
MCU : Maîtres de Conférences des Universités
MCU-PH : Maîtres de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeurs des Universités
PU-PH : Professeurs des Universités et Praticiens Hospitaliers
TDMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR : Unité Mixte de Recherche
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER.

Remerciements

Tout d'abord, un grand merci aux membres de mon jury de thèse, votre présence et vos conseils m'ont été et me seront toujours très profitables :

Au Président du jury, Monsieur Le Professeur Patrice Faure,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être le Président de mon jury de thèse.

Merci pour votre ouverture d'esprit, vos conseils et votre disponibilité. Merci de m'avoir accompagné au cours de mes 3 semestres effectués au sein du Département de Biochimie Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Grenoble.

Au directeur de thèse, Monsieur le Docteur François Laporte,

Merci d'avoir accepté d'encadrer mon travail. Merci de m'avoir guidé tout au long de ce projet. Merci pour votre patience, votre pragmatisme, votre disponibilité. Merci pour tous vos conseils et vos enseignements.

A Mme le Professeur Pascale Hoffmann. Merci d'avoir accepté d'être membre de mon jury. Merci pour vos conseils, votre pragmatisme et votre bienveillance.

A Madame le Docteur Dorra Guergour. Merci d'avoir accepté d'être membre de mon jury. Merci pour votre soutien, votre encadrement, vos conseils et votre disponibilité.

Ensuite, je souhaite manifester ma gratitude envers tous ceux qui ont contribué à l'aboutissement de ce projet :

Je tiens à remercier les patientes du service de procréation médicalement assistée qui ont bien voulu participer à l'étude des dosages urinaires. Merci pour votre contribution et pour vos efforts.

A toute l'équipe de la plateforme commune de biochimie,

Merci aux agents de la réception centralisée des prélèvements d'avoir contribué à mon travail sur les prélèvements urinaires. Merci pour votre investissement et votre patience. Vous avez été d'un grand soutien.

Merci aux techniciens, et particulièrement à Celine Maury, qui a énormément contribué à la réalisation de ce travail. Merci pour ta disponibilité, pour ton investissement. Merci pour tes conseils, tes idées, ton pragmatisme et ton efficacité. A tous les autres pour leur disponibilité, leur patience et leur sympathie. J'ai beaucoup apprécié de travailler en votre compagnie.

Aux biologistes du Centre Hospitalier d'Annecy. Merci de m'avoir accueilli dans votre structure. Merci pour vos conseils, votre soutien et votre présence dans les moments difficiles. Merci pour toute l'aide que vous m'avez apporté. Je vous suis très reconnaissant.

A mes parents, pour leur présence, leur patience, leurs conseils et leurs encouragements. Merci d'avoir lu mon manuscrit et d'avoir contribué à sa qualité.

A mon frère pour son soutien.

A ma cousine pour son aide et ses encouragements.

SOMMAIRE

Remerciements	3
SOMMAIRE	7
Index des illustrations	10
Figures	10
Tableaux	10
Listes des abréviations utilisées	12
Listes des annexes	12
INTRODUCTION-GENERALITE	13
I. Transfert du dosage sérique des hormones LH, estradiol et progestérone des analyseurs Centaur® (XP et CP) vers le Dimension VISTA 1500®	19
I.1. Introduction.....	20
I.2. Matériel et Méthode :	22
I.2.1. Les analyseurs.....	22
I.2.1.1. Le Centaur XP et	22
I.2.1.2. Le Dimension Vista 1500	22
I.2.2. Principe des méthodes	23
I.2.3. Vérification de la méthode et rédaction du document SH FORM 43 :	24
I.2.3.2. Comparaison des méthodes.....	25
I.2.4. Evaluation des incertitudes de mesure :	26
I.2.5. <i>Maitrise des risques et Impact du changement de technique sur les délais de rendu</i>	27
I.2.6. Traitement des données :	29
I.3. Résultats	30
I.3.1. Vérification sur site :	30
I.3.2. Evaluation de l'incertitude de mesure	34
I.3.3. Comparaison des méthodes :	36
I.3.3.3. Comparaison aux autres techniques :	46
I.3.3. Maitrise des risques et Impact de la nouvelle organisation sur les délais d'analyse :	48
I.4. Discussion	50
I.4.1 Vérification sur site de la nouvelle méthode	50
I.4.2. Comparaison des méthodes :	53
I.4.3. Impact clinique potentiel	53
I.4.4. Respect du contrat et délai de rendu	55
I.4.5. Bilan du changement d'automate :	57

II) Comparaison des concentrations sériques et urinaires de la LH et de l'estradiol chez les femmes suivies dans le service de procréation médicalement assistée.....	58
II.1 Introduction :.....	59
II.2 Matériel et méthode	60
II.2.1. Analyseur	60
II.2.2. Etude préliminaire	60
II.2.3. Etude de la stabilité dans l'urine :	60
II.2.4. Protocole d'essai	61
II.3 Résultats	63
II.3.1. Fiabilité des dosages urinaires	63
II.3.2 Test de stabilité de l'estradiol et de la LH dans les urines :	63
II.3.3 Comparaison des résultats sériques et urinaires	64
II.4. Discussion :	71
II.4.1. Fiabilité des dosages urinaires.....	71
II.4.2. Application aux cycles de PMA.....	72
CONCLUSION	74
BIBLIOGRAPHIE.....	77
ANNEXES.....	81
Annexe 1 : convention clinico-biologique signée entre le DBTP et le service de PMA.....	82
Annexe 2 : Carte de contrôle des CIQ pour l'estradiol obtenus pour le Vista 1	83
Annexe 3 : lettre d'information aux patientes et protocole de dosages	84

Index des illustrations

Figures

Figure 1 : Estradiol et son métabolisme.....	16
Figure 2 : Suivi des notes et z-scores par rapport au groupe de pairs	34
Figure 3 : Résultats des corrélations pour l'estradiol	40
Figure 4 : Diagramme des différences pour l'estradiol41	
Figure 5 : Résultats des corrélations pour la LH.....	42
Figure 6 : Diagramme des différences pour la LH	43
Figure 7 : Résultats des corrélations pour la progestérone	44
Figure 8 : Diagramme des différences pour la progestérone	45
Figure 9 : Diagramme de Youden de l'estradiol, de la LH et de la progestérone construit sur deux résultats d'EEQ.	47
Figure 10 : Comparaison du nombre et de l'importance des retards.....	49
Figure 11 : Répartition des causes de retard au cours de la période février-avril.....	49
Figure 12 : Répartition du nombre de dosages selon les jours avant l'ovulation.....	64
Figure 13 : Etude de la corrélation entre les résultats de l'estradiolémie et de l'estradiolurie corrigée.	65
Figure 14 : Evolution comparée des différences entre estradiolémie et estradiolurie sur deux dosages consécutifs.....	66
Figure 15 : relation entre le nombre d'ovocyte et l'estradiolémie (en rouge) et entre le nombre d'ovocyte et l'estradiolurie (en bleu).....	67
Figure 16 : Etude de la corrélation entre concentration sérique et concentration urinaire de la LH... ..	68
Figure 17 : Evolution comparée des concentrations sériques et urinaires en LH pour 25 couples d'échantillons sur 2 dosages consécutifs	69
Figure 18 : Evolution comparée des concentrations sériques et urinaires pour la LH en fonction des jours avant l'ovulation.....	70

Tableaux

Tableau 1 : Evolution des demandes de dosages des hormones de fertilité entre 2010 et 2014.....	17
Tableau 2 : Méthode de calcul des trois niveaux de tolérance analytique selon C.Ricos.	20
Tableau 3 : Caractéristiques des méthodes LOCI et CMIA.....	23
Tableau 4 : Définition des critères pour l'analyse des retards.....	28
Tableau 5 : Coefficients de variation répétabilité pour chaque hormone à l'issu des tests de vérification sur site.	30
Tableau 6 : Coefficients de variation de fidélité intermédiaire pour chaque hormone à l'issu des tests de vérification sur site.....	31
Tableau 7 : Impact de la prolongation des période de validité des calibrations sur les CV de fidélité intermédiaire.....	32
Tableau 8 : Impact de la prolongation des période de validité des calibrations sur les CV de fidélité intermédiaire. CV et moyennes des résultats de progestérone sur le vista 3 :	32
Tableau 9 : Comparaison des biais de justesse de l'estradiol, de la LH et de la Progestérone pour le vista 1 et le Vista 3.	33
Tableau 10 : Incertitudes de mesure des 3 paramètres estradiol, LH et progestérone 5 mois après la vérification de méthode.....	35

Tableau 11 : Comparaison des conditions de dosages entre le Dimension VISTA et le Centaur XP.....	36
Tableau 12 : Gamme des concentrations testées pour la comparaison de méthode	37
Tableau 13 : Comparaison des délais de rendu pour la période de février à avril en 2014 et 2015 ...	48
Tableau 14 : Avantages et inconvénients de chaque solution de traçabilité des retards.	56
Tableau 15 : Résultats de fidélité intermédiaire pour l'estradiolurie.	63

Listes des abréviations utilisées

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire
CIQ : Contrôle interne de qualité
COFRAC : Comité FRANçais d'ACcréditation
DBTP : Département de biochimie, pharmacologie et toxicologie
EEQ : Evaluation Externe de la Qualité
FIV : Fécondation In Vitro
FSH : Hormone Stimulant les Follicules
ICSI : Injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde
IET : Indice d'Ecart Type
LH : Hormone Lutéinisante
PMA : Procréation médicalement assistée
RCV : Ratio de coefficient de variation
SFBC : Société Française de Biologie Clinique
SIL : Système Informatique du Laboratoire

Listes des annexes

Annexes 1 : Convention (contrat clinico-biologique) signée entre le DBTP et le service de PMA

Annexes 2 : Carte de contrôle des CIQ pour l'estradiol obtenus pour le Vista 1

Annexe 3 : Lettre d'information aux patientes et protocole de dosage

INTRODUCTION-GENERALITE

L'aide médicale à la procréation a pour objectif de diagnostiquer les causes d'infertilité et d'aider les couples infertiles à concrétiser leur désir d'enfant. Elle occupe une place de plus en plus importante dans nos sociétés.

La fertilité est l'aptitude d'un couple à concevoir. On parle d'infertilité lorsqu'un couple n'est pas parvenu à concevoir après un à deux ans de rapports complets et rapprochés infructueux (1). Cette infertilité est dite primaire s'il n'y a jamais eu de grossesse. Elle est dite secondaire en cas d'antécédent de grossesse. Actuellement, on considère que 10 % des couples sont concernés par des problèmes de fertilité. Ils sont nombreux et affectent l'homme (30% des cas), la femme (20% des cas) ou les deux (40 % des cas). Ils peuvent être d'origine mécaniques, anatomiques, biologiques ou environnementales (2). Le recul de l'âge des femmes à la première conception est une cause importante mais il existe une diminution globale de la fertilité dans plusieurs régions du monde.

Les solutions envisageables dépendent beaucoup de la nature et de la gravité des troubles. La surveillance d'ovulation avec ou sans stimulation en vue d'un rapport « programmé » (forme la plus simple et la moins invasive), les inséminations intra utérines et la fécondation in vitro (sans ou avec injection intra-cytoplasmique du spermatozoïde) sont les méthodes actuellement utilisées. Chacune d'entre elles présente des indications spécifiques.

En 2012, 142 708 tentatives ont été répertoriées par l'agence de la biomédecine (3). Ce nombre était de 131 736 en 2009. La proportion de tentative se concrétisant par une naissance varie de 12,4 % (dans le cas des inséminations intra conjugales) et 18,7 % (dans le cas des transferts d'embryons) (3). En 2014, le service de PMA du CHU de Grenoble a réalisé 3136 consultations et accompagné 1648 cycles dont 39% de surveillances d'ovulation, 34 % de Fécondations in vitro, 16 % d'insémination intra-utérine et 11 % de transferts d'embryons congelés.

Quelle que soit la solution envisagée, la biologie et l'échographie sont des supports indispensables et indissociables dans l'accompagnement des patientes. L'échographie permet de suivre le nombre, la taille des follicules et l'épaisseur de l'endomètre. La biologie peut se décliner en deux grands ensembles : La manipulation et la préparation des gamètes et les dosages hormonaux.

L'estradiol, la progestérone, l'hormone lutéinisante (LH) et la folliculostimuline (FSH) sont les quatre hormones régulièrement dosées dans le sérum des patientes. Elles sont utiles dans les bilans d'infertilité et dans le suivi des cycles. LH et FSH sont des marqueurs de fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire. La LH est un indicateur de l'ovulation. L'estradiol est un reflet de la croissance et de la maturation folliculaire. La progestérone confirme l'ovulation et permet, dans le contexte de fécondation in vitro, d'évaluer la maturation de l'endomètre et de déterminer si le futur embryon sera implantable ou non (4).

Connaître le métabolisme des hormones est nécessaire à la compréhension des contraintes imposées aux techniques de dosage et à l'interprétation des résultats.

La LH est une hormone peptidique glycosylée synthétisée par l'hypophyse et libérée de manière pulsatile dans la circulation. La régulation de sa production et de sa libération est

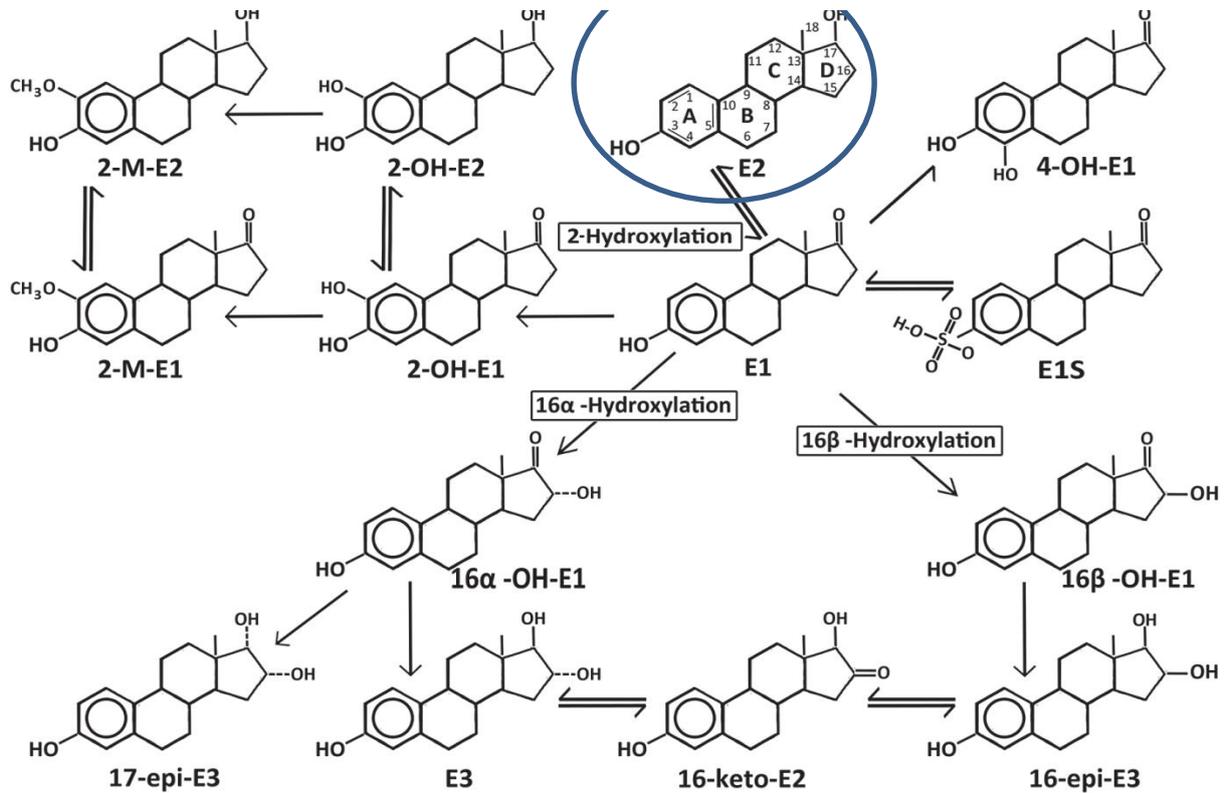
complexe et fait intervenir de nombreux acteurs dont les plus importants sont la GnRH synthétisée par l'hypothalamus et les hormones sexuelles circulantes. Sa sécrétion évolue tout au long du cycle en terme d'intensité et de fréquence (d'une sécrétion toutes les 2 heures à une sécrétion par heure en moyenne entre le début et le milieu du cycle) (5). L'élimination de la LH fait intervenir, en parallèle, une désialylation hépatique, une destruction intracellulaire lysosomiale et une filtration rénale. La demi-vie de la LH est de l'ordre de 20 minutes (6)(5). Il existe une très grande diversité de métabolites circulants selon la nature et l'importance de la désialylation. On retrouve dans les urines un mélange de formes intactes et métabolisées. Par conséquent, les dosages sériques sont soumis aux fluctuations physiologiques. Par ailleurs, la LH partage des parentés structurales importantes avec de nombreuses autres hormones comme la *béta*-HCG ou la FSH. Ceci impose aux techniques de dosage d'être très spécifiques.

L'estradiol est issu de la transformation du cholestérol. Il est majoritairement produit par les cellules de la granulosa. Une fraction est aussi issue de la transformation périphérique (peau, muscle, tissu adipeux) des androgènes produits par les glandes surrénales. Son taux de production journalier varie en fonction du stade du cycle menstruel. Il a été estimé à environ 70 µg par jour en début de phase folliculaire. Cette production augmente ensuite à 500-800 µg par jour à proximité du pic pré-ovulatoire. Elle redescend vers 250 µg par jour en milieu de phase lutéale. La forme libre circulante ne représente que 1 à 3 % et demeure stable au cours du cycle car l'estradiol induit la synthèse de sa protéine de transport (la SHBG : Sex Hormone Binding Globulin) (7).

L'estradiol et l'estrone circulantes s'inter-convertissent. Le métabolisme hépatique et rénal implique l'action d'enzymes appartenant à la superfamille des cytochromes P450. Ces enzymes sont sensibles à des effets inducteurs ou inhibiteurs. Il existe donc une grande variabilité intra et inter individuelle de la quantité et du type des métabolites formés. Une partie de cette diversité est explicitée dans la figure 1. Il existerait près de 100 dérivés différents (7).

L'estradiol est éliminé par voie urinaire et biliaire, majoritairement sous forme de métabolite. La forme urinaire native représente entre 5 et 10 % des estrogènes urinaires totaux (8).

Figure 1 : Estradiol et son métabolisme. Les transformations ont principalement lieu dans le foie. Chacun de ces produits est susceptible d'être glucuro ou sulfoconjugués. Seuls les métabolites principaux sont montrés. E1 : Estrone ; E2 : Estradiol (5)



La concentration sérique en progestérone augmente en deuxième partie de cycle. Elle confirme l'ovulation et témoigne de la constitution du corps jaune. Elle est transportée par la transcortine, l'albumine et l'orosomucoïde. Elle est métabolisée par le foie en prégnandiol puis est glucuroconjuguée. L'élimination est principalement urinaire (60 %) (9).

Les hormones stéroïdiennes sont très proches sur plan structural. Progestérone, estradiol, estrone ne se distinguent que par quelques atomes de carbone ou d'oxygène. La spécificité des techniques est là aussi un paramètre fondamental. Par ailleurs, ces molécules ne sont pas immunogènes et imposent des artifices techniques pour obtenir des anticorps. Ces petites molécules ne peuvent être dosées qu'en compétition (10).

Le dosage de ces hormones peut se faire sur différentes matrices : sérum ou plasma, urine et salive.

Le sérum et le plasma sont actuellement les milieux de référence (11).

Les analyses urinaires actuellement utilisées sont basées sur un principe d'immunochromatographie et sont disponibles en officine. Elles servent à identifier la période de fertilité soit pour augmenter les chances de procréation. Ces tests ne sont pas quantitatifs et ne peuvent pas se substituer aux dosages sanguins. Parmi les différents métabolites présents dans l'urine, l'estrone glucuronide a été identifiée comme le meilleur marqueur de la période fertile (12) à la fois pour son abondance et sa bonne adéquation avec la variation des concentrations sériques. L'estradiol a été testée et bien que peu abondante, elle semble refléter les variations sanguines (13).

Les analyses salivaires d'estradiol et de progestérone sont pour le moment inadaptées à la procréation médicalement assistée. En effet, elles emploient des techniques de type radioimmunos dosage. Elles sont longues et pas encore automatisables (14). Les services cliniques attendent, au contraire, les résultats rapidement pour réaliser les adaptations posologiques des hormones de stimulations. Par ailleurs, aucune analyse de LH n'est possible car cette hormone peptidique n'est pas éliminée dans la salive. Or son dosage est indispensable pour le suivi des patientes.

Diverses méthodes de dosage existent. Les méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse sont des méthodes de référence pour l'estradiol et la progestérone. Il n'y a pas de méthode de référence pour la LH.

Les autres approches sont basées sur des méthodes immunométriques. Celles-ci sont très diverses. Certaines analyses sont réalisées en phase hétérogène (présence d'une ou plusieurs phases de lavage au cours du dosage) ou en phase homogène (aucune étape de lavage). La nature des anticorps utilisés et l'origine de la production varient (monoclonaux ou polyclonaux ; mouton, souris...). L'analyse peut se faire en excès d'antigène (compétition) ou en excès d'anticorps (sandwich). Il existe un grand nombre de techniques de détection (fluorescence, électro-chimiluminescence, chimiluminescence) et de principe de génération du signal (enzymatique, chimique, transfert d'énergie)

En conséquence, les performances analytiques des méthodes de dosages peuvent être très variables. Les coefficients de variation inter-techniques diffèrent selon la concentration. Ils peuvent être de l'ordre de 20 % pour l'estradiol, de 30% pour la progestérone et 16 % pour la LH (15). Actuellement, il est préférable de réaliser le suivi d'une patiente dans le même laboratoire.

Le Département de Biochimie, Pharmacologie et Toxicologie (DBTP) du laboratoire de biologie du CHU de Grenoble contribue à la prise en charge des patientes suivies sur le site de l'hôpital. Les analyses de LH, estradiol et progestérone sont réalisées quotidiennement sur sérum à l'aide d'analyseurs multiparamétriques automatisés. Les dosages effectués ne concernent pas la phase diagnostique mais uniquement la phase de suivi.

Au cours des 5 dernières années, les demandes de LH et d'estradiol ont augmenté de 20 %. Les demandes de progestérone ont fortement chuté entre 2011 et 2012. Cette chute est liée à une réévaluation des prescriptions par le service de PMA. Le tableau 1 retrace l'évolution du nombre d'examen réalisés entre 2010 et 2014.

	LH	Estradiol	Progestérone
2010	2488	2487	1239
2011	2709	2698	1302
2012	2726	2720	530
2013	2905	2897	672
2014	3139	3137	881

Tableau 1 : Evolution des demandes de dosages des hormones de fertilité entre 2010 et 2014

Le laboratoire dosait jusqu'à présent ces paramètres à l'aide de l'analyseur Centaur XP. Un autre analyseur, le Centaur CP, était utilisé en repli en cas de panne du XP. Transférer le dosage des hormones de fertilité sur le DIMENSION VISTA®1500 de Siemens était un projet prévu depuis 2010 mais tous les réactifs n'étaient pas encore prêts. La progestérone n'a été disponible qu'à partir d'octobre 2014. C'est donc, en janvier 2015, que le changement d'automate a été réalisé.

L'organisation du laboratoire doit permettre de rendre les résultats dans un délai compatible avec les contraintes organisationnelles d'un service de PMA. En effet, les patientes viennent le matin dans le service médical pour une consultation et réaliser leur prélèvement sanguin. Les résultats sont interprétés en fin de matinée pour réaliser les éventuelles adaptations posologiques et définir le cas échéant les dates de ponctions, d'insémination intra utérine ou de transfert d'embryons. Les femmes suivies pour des cycles de fécondation in vitro (FIV) font elles-mêmes leur injection de FSH et sont prévenues en début d'après-midi de la dose qu'elles devront s'administrer. Le DBTP s'est engagé à rendre les résultats avant 11 heures. La convention établie avec le service de PMA est présentée dans l'annexe 1.

Le transfert de méthode pourrait impacter le délai de rendu. Il a donc été réévalué après la mise en place de la nouvelle méthode. De plus, le nombre et les causes des retards ont été analysés.

Depuis une ordonnance du 13 janvier 2010, tous les laboratoires de biologie médicale doivent être accrédités. L'accréditation certifie la qualité des analyses. La norme NF EN ISO 15189 version 2012 est actuellement en vigueur. Le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) est l'instance réglementaire responsable de l'évaluation des laboratoires de biologie médicale. Toutes les étapes depuis le prélèvement de l'échantillon jusqu'au rendu du résultat doivent être surveillées. Tous les points critiques pouvant influencer la qualité du résultat doivent être identifiés et maîtrisés. L'ensemble des caractéristiques des méthodes de dosages ainsi que les preuves de la maîtrise des risques sont synthétisés sous la forme d'un document appelé SH FORM 43 qui fait l'objet d'un examen par le COFRAC.

Le transfert de méthode a été l'occasion de réaliser ce document pour les paramètres estradiol, LH et progestérone dans le cadre d'une demande d'extension d'accréditation.

La mise place et l'évaluation des nouvelles méthodes de dosages, l'étude des délais de rendu et du respect du contrat ainsi que l'analyse de risques sont présentés dans la première partie.

Dans un second temps, une évaluation du dosage urinaire de l'estradiol et de la LH a été réalisée. L'objectif était d'étudier si les nouvelles méthodes permettraient un dosage urinaire fiable, représentatif des variations sériques dans le but d'améliorer le confort des patientes suivies en PMA.

Ce travail est présenté dans une seconde partie.

**I. Transfert du dosage sérique des hormones LH,
estradiol et progestérone des analyseurs Centaur®
(XP et CP) vers le Dimension VISTA 1500®**

I.1. Introduction

Les techniques immunométriques ont évolué depuis leur développement dans les années 1960. Elles sont devenues plus rapides, plus sensibles et sont maintenant entièrement automatisées pour la majeure partie d'entre elles. Les améliorations ont permis le développement de techniques en phase homogène et de réduire les coûts et la durée des analyses. C'est dans les années 1990 que la technique LOCI® (Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay) a été développée (16). Elle est appliquée à de nombreux dosages dont les hormones de la fertilité (LH, estradiol et progestérone). Cette méthode est intégrée à l'analyseur Dimension Vista 1500® de Siemens.

Le laboratoire de biochimie du centre hospitalo-universitaire de Grenoble est doté de trois exemplaires de cet automate. Ils permettent de réaliser des analyses de biochimie générales et spécialisées. Les dosages d'estradiol, de LH et de progestérone sont réalisés sur deux d'entre eux.

Tout transfert de méthode impose une vérification des performances annoncées par le fournisseur et une comparaison avec l'ancienne technique.

La vérification d'une méthode correspond à l'évaluation de sa précision (répétabilité et reproductibilité), de sa justesse et de son exactitude. Des résultats sont précis lorsqu'ils sont peu dispersés autour d'une valeur moyenne. Ils sont justes lorsque cette moyenne ne se s'éloigne pas significativement d'une valeur de référence. L'exactitude évalue l'éloignement d'un résultat par rapport à cette valeur de référence. La difficulté est de déterminer les limites acceptables.

Trois approches sont possibles : le besoin des cliniciens, la variabilité biologique et l'état de l'art. En dehors de quelques paramètres tels que l'hémoglobine glyquée, la troponine ou le cholestérol, il est très difficile d'établir des limites consensuelles avec les médecins car les exigences varient selon les spécialités. La variabilité biologique est un critère de plus en plus utilisé. Carmen Ricos et son équipe ont beaucoup travaillé sur les variations dans le temps des paramètres biologiques chez un même individu et chez des individus différents (17). Elles s'expriment en coefficient de variation intra et inter individuel. Ricos et son équipe ont établi une base de données répertoriant ces CV pour près de 350 paramètres. Les limites d'acceptation de la précision et de la justesse sont établies à l'aide de ces CV. Trois niveaux de tolérance ont été définis. Ceux dit « minimum » correspondent à la tolérance maximale. Le niveau « optimal » est le plus exigeant. Le niveau « souhaitable » est une limite intermédiaire. Les modalités de calcul sont présentées dans le tableau 2.

L'état de l'art représente les aptitudes des techniques à un moment donné.

	Précision	Biais
Tolérance optimale	CV méthode $< 0,25 \times CV_i$	$< 0,125 \sqrt{(CV_i^2 + CV_g^2)}$
Tolérance souhaitable	CV méthode $< 0,5 \times CV_i$	$< 0,250 \sqrt{(CV_i^2 + CV_g^2)}$
Tolérance minimal	CV méthode $< 0,75 \times CV_i$	$< 0,370 \sqrt{(CV_i^2 + CV_g^2)}$

Tableau 2 : Méthode de calcul des trois niveaux de tolérance analytique selon C.Ricos. CV_i (variabilité intra individuelle) ; CV_g (variabilité interindividuelle)

La comparaison de méthode a pour objectif d'évaluer la concordance des résultats entre l'ancien et le nouvel analyseur et de mesurer l'éventuel impact clinique des changements observés.

Cette première partie aborde :

- Les résultats de la vérification
- La comparaison des méthodes
- La maîtrise des risques
- L'évaluation du délai de rendu et du nombre de bilans rendus après 11 heures.

I.2. Matériel et Méthode :

I.2.1. Les analyseurs

I.2.1.1. Le Centaur XP et Le Centaur CP

Ces analyseurs multiparamétriques réalisent des immunodosages. Les réactifs et les calibrants sont communs aux deux appareils.

Les courbes d'étalonnage sont mémorisées par l'automate et ajustées mensuellement avec deux points de calibration. Trois niveaux de contrôles de qualité sont passés tous les jours sur le Centaur XP. Le Centaur CP n'est utilisé qu'en cas de panne du Centaur XP. Les calibrations sont mensuelles. Les CIQ sont passés quotidiennement pour le Centaur XP et 2 fois par semaine pour le Centaur CP.

I.2.1.2. Le Dimension Vista 1500

Il s'agit d'un analyseur entièrement automatisé, multiparamétrique. Le dosage des hormones de la fertilité est réalisé sur deux automates en miroir.

Les calibrations sont faites, selon les recommandations du fournisseur, une fois par mois pour l'estradiol et la LH (LOCI 8 CAL référence KC 646) et une fois par semaine pour la progestérone (PROG CAL référence KC 637). La progestérone et l'estradiol sont calibrés à l'aide de 5 niveaux de concentrations chacun étant passés 3 fois. La LH est calibrée avec 5 niveaux passés 5 fois. Trois niveaux de contrôles de qualité sont passés quotidiennement.

Les réactifs (référence K6464 ; K6463 et K6461) sont contenus dans des cartouches appelées « flex » divisées en plusieurs puits fermés par un film plastique. Chaque puit est caractérisé par un nombre de tests et une stabilité. Cette stabilité est plus faible une fois le puit ouvert. L'analyseur décompte automatiquement le nombre de tests restant et le délai avant péremption des puits et du « flex ».

Le Vista fait systématiquement une aliquote des échantillons dosés. Elle est conservée dans une plaque d'aliquotage pour une durée de 2 heures. Tout ajout d'analyse ou dilution éventuelle est réalisé directement à partir de cette aliquote ce qui évite de recourir au tube primaire et constitue un gain de temps.

Le tableau 3 donne des informations complémentaires sur les méthodes du Vista et de Centaur.

Tableau 3 : Caractéristiques des méthodes LOCI et CMIA pour le dosage des hormones de fertilité sur dimension Vista et Centaur XP

	paramètres	Vista	Centaur
Stabilité des réactifs à bord	Estradiol	30 jours puits fermés 4 jours puits ouverts	28 jours
	Progestérone	30 jours puits fermés 4 jours puits ouverts	28 jours
	LH	30 jours puits fermés 7 jours puits ouverts	28 jours
Nombre de tests par flacon de réactif	Estradiol	100	100
	Progestérone	80	50
	LH	100	60
Stabilité des calibrations	Estradiol	30 jours	21 jours
	Progestérone	7 jours	28 jours
	LH	30 jours	28 jours

I.2.2. Principe des méthodes

Dans les deux cas, il s'agit d'immunochimiluminescence. L'estradiol et la progestérone sont dosés par compétition alors que la LH est dosée en technique sandwich.

Dans la méthode LOCI™, l'estradiol et la progestérone du sérum sont mis en compétition avec de l'estradiol ou de la progestérone fixée sur des microbilles photosensibles face à un anticorps biotinylé spécifique, appelé « conjugué ». Des microbilles chimiosensibles recouvertes de streptavidine sont ajoutées au mélange. La biotine a une très forte affinité pour la streptavidine. Les complexes immuns formés, associant les deux microparticules sont réactifs. Sous l'effet d'une lumière à 680 nm la particule photosensible libère de l'oxygène singulet qui réagit la particule chimiosensible. Cette réaction génère une lumière à 620 nm(16). L'intensité du signal lumineux est inversement proportionnelle à la concentration en estradiol ou en progestérone. Le dosage de la LH est similaire mais la particule photosensible est recouverte d'anticorps anti-LH et le signal est proportionnel à la concentration.

Les Centaur utilisent la technique de CMIA™ (Antibody Conjugated Magnetic Immunoassay). Le principe est comparable à la technique LOCI™ sauf que l'estradiol, la progestérone ou les anticorps anti-LH sont fixés sur des particules paramagnétiques et que les anticorps « conjugués » sont couplés à un ester d'acridinium. Une étape de lavage est indispensable pour éliminer les anticorps en excès. Au cours de ce lavage, les particules sont

transitoirement retenues par un champ magnétique. L'hydrolyse de l'ester d'acridinium est associée à l'émission de lumière dont l'intensité est mesurée (18).

Les signaux sont transformés en concentration à l'aide de la courbe de calibration.

I.2.3. Vérification des méthodes et rédaction du document SH FORM 43 :

Les vérifications de méthode sont faites suivant les recommandations du guide SH GTA 04, révision 1 du COFRAC en vue de l'accréditation en portée A des hormones estradiol, LH et progestérone. La portée A correspond aux méthodes déjà validées par le fournisseur, pour lesquelles aucune modification n'est apportée par le laboratoire. Elle a pour objectif de s'assurer que les performances de l'outil, requises par le biologiste et annoncées par le fournisseur, sont reproduites au laboratoire. Deux parties sont envisagées :

- La vérification sur site des performances du couple analyseur/réactif
- La comparaison de méthodes entre le Centaur XP et le Dimension VISTA évaluant la commutabilité des deux analyseurs

I.2.3.1. Critères de fiabilité

Seules la répétabilité, la fidélité intermédiaire, l'exactitude et la justesse sont évaluées sur site. Les autres critères (intervalle de dosage, limite de détection, analyse des substances interférentes...) n'ont pas à être réévalués dans le cadre d'une portée A (19).

Répétabilité et fidélité intermédiaire : La répétabilité représente la dispersion des résultats sur une série de mesures faite dans les mêmes conditions, le même jour. La fidélité intermédiaire représente la dispersion des résultats lorsque les analyses sont faites sur des jours différents avec des conditions différentes (calibrations, lot de réactifs, opérateur technique, etc.). Elles sont étudiées en utilisant les contrôles de qualité fournis par la société Biorad (Liquichek™ Immuno Assays plus, lot 40850).

Un minimum de trente passages est recommandé pour obtenir une estimation fiable de la variabilité. La répétabilité a été testée en réalisant 30 mesures successives de chaque niveau pour la LH et la progestérone. Pour des raisons de disponibilité de réactifs, seul les niveaux 1 et 3 sont testés en pour l'estradiol. La fidélité intermédiaire est testée sur 30 valeurs, un passage de chaque niveau par jour.

Les résultats sont exprimés en coefficient de variation (CV) :

$$cv = \frac{\text{écart type de l'analyseur}}{\text{moyenne des résultats de l'analyseur}} \times 100$$

La justesse : elle est définie comme l'étroitesse de l'accord entre la moyenne des résultats du laboratoire et une moyenne de référence. Elle est évaluée pour chaque niveau de CIQ à l'aide du logiciel URT de Biorad. La moyenne de référence choisie est la moyenne des résultats des pairs. Ces derniers correspondent aux résultats obtenus par tous les analyseurs du même type utilisant le même lot de contrôle.

Les paramètres de variabilité et de justesse sont suivis sur une période de 5 mois. Les trois niveaux de CIQ sont passés sur chaque automate tous les jours. Chaque mois, les indices d'écart type (IET) et les ratios de coefficient de variation (RCV) sont calculés à l'aide du Logiciel URT de Biorad et analysés. L'IET évalue l'éloignement de la moyenne d'un des analyseurs Vista à la moyenne des résultats des pairs en nombre d'écart type. Le RCV compare le coefficient de variation d'un analyseur du laboratoire avec celui de l'ensemble des analyseurs de même type utilisant le même réactif et le même lot de contrôle.

$$IET = \frac{\text{moyenne d'un analyseur} - \text{moyenne des pairs}}{\text{écart type des pairs}}$$

$$RCV = \frac{\text{coefficient de variation de l'analyseur}}{\text{coefficient de variation des pairs}}$$

La limite acceptable pour l'IET est de plus ou moins 1,2. Un RCV inférieur à 1,2 est acceptable. Au-delà, une action corrective doit être envisagée.

De plus, la variabilité totale et la justesse des analyseurs sont évaluées sur le long terme par les moyennes et les CV cumulés.

Par ailleurs, afin de vérifier l'impact clinique potentiel de la variabilité des analyses, deux niveaux de contrôles ont été ajoutés pour l'estradiol à des valeurs seuils d'interprétation :

- 50 pg/ml : qui représente le seuil pour un bon freinage de l'axe gonadotrope
- 4000pg/ml : qui représente un critère d'hyperstimulation ovarienne.

Pour cela, 6 sérums de concentrations comprises entre 25 et 66 pg/ml et 3 sérums de concentrations comprises entre 2800 et 5720 pg/ml sont mélangés, homogénéisés et dosés sur chaque Vista pour contrôler la concentration obtenue. La valeur étant proche du seuil souhaité, chaque mélange est ensuite réparti en 26 aliquotes de 140 µl chacun (volume permettant un passage sur chaque Vista) puis congelés à - 20°C (la stabilité a été estimée à 6 mois dans le sérum congelé (20)). Une aliquote est analysée chaque jour sur chaque automate pendant 1 mois.

Exactitude : Elle correspond à l'étroitesse de l'accord entre une mesure et une moyenne de référence. Elle est mesurée à l'aide des évaluations externes de qualité. L'association ProBioQual produit et organise la distribution des sérums tests. Deux sérums sont reconstitués et analysés tous les deux mois. Les résultats des différents automates sont ensuite comparés à la moyenne des pairs et sont rendus sous forme d'un biais (c'est-à-dire d'un écart en pourcentage par rapport à la moyenne de référence), d'un z score (c'est-à-dire d'un écart en nombre d'écart type) en pourcentage et d'une note globale représentant notre position par rapport aux limites acceptables.

I.2.3.2. Comparaison des méthodes

Nous avons pu comparer la précision du Centaur XP et des Vista en confrontant les CV des 3 niveaux de CIQ du lot 40850 du « Liquicheck Immunoassays Plus ». Les données sont extraites du logiciel URT.

La comparaison des résultats est faite en réalisant les analyses quotidiennes successivement sur chaque automate. Trente valeurs sont recommandées. Pour enrichir les données en valeurs hautes des prélèvements de cinq femmes enceintes de moins de 3 mois ont été rajoutés pour l'estradiol et la progestérone.

Pour chaque paramètre, diagramme de dispersion et diagramme des différences sont utilisés pour analyser les résultats. Les discordances entre deux analyseurs sont reconstrués. Une différence est considérée comme discordante si elle s'écarte de plus de 3 écart-types de la moyenne des différences calculées.

Les deux méthodes sont considérées comme transposables si au moins 95 % des points des diagrammes de dispersion sont compris dans les limites de suivis. Les limites de suivis représentent un intervalle qui tient compte de la variabilité des deux analyseurs comparés et nécessite le calcul d'un écart type combiné :

$$\sigma(\text{limite de suivi}) = \sqrt{3\sigma^2(\text{méthode Vista}) + 3\sigma^2(\text{méthode Centaur XP})}$$

Les écarts types utilisés sont ceux de la fidélité intermédiaire

Le calcul est réalisé pour chaque niveau de contrôle. Les limites de suivi sont appliquées aux moyennes de fidélité intermédiaire des CIQ pour encadrer la droite de régression et les diagrammes des différences. Une courbe de tendance passant par les trois niveaux de CIQ est ensuite calculée par le logiciel Excel®.

Par ailleurs, les performances globales de chaque méthode de dosage sont comparées aux autres méthodes à l'aide de graphique de Youden construit avec les résultats des EEQ.

I.2.4. Evaluation des incertitudes de mesure :

L'évaluation des incertitudes de mesure est une exigence de la norme NF EN ISO 15189. Elle est réalisée à l'aide du document SH FORM GTA 14 du COFRAC (21). L'objectif est d'aider les cliniciens dans l'interprétation des résultats. De nombreuses méthodes de calcul existent (22).

Trois méthodes de calcul sont considérées et confrontées.

La première, dite « CIQ +étalons fournisseur » utilise les écarts types de fidélité intermédiaire et les incertitudes sur les calibrateurs.

$$I = k \times \sqrt{\sigma^2(CQI) + \sigma^2(\text{fournisseurs})}$$

La deuxième, est basée sur les résultats des CIQ et des EEQ :

$$I = k \times \sqrt{\sigma^2(CQI)^2 + \sigma^2(EEQ)}$$

$$\sigma^2(EEQ) = \sqrt{\frac{E}{\sqrt{3}} + \sigma^2(E)}$$

Où E est la moyenne des écarts d'exactitude et $\sigma(E)$ la dispersion des écarts d'exactitude.

La troisième est basée sur les contrôles internes externalisés. Le mode de calcul est le même que celui basé sur les EEQ mais on ne travaille pas avec les biais d'exactitude mais avec les biais de justesse.

Le coefficient k est un coefficient dit « d'élargissement ». Une valeur de 2 sera utilisée.

Les calculs sont réalisés après 5 mois de fonctionnement sur la base des écart-types de fidélité intermédiaire cumulés.

1.2.5. Maitrise des risques et impact du changement de technique sur les délais de rendu

1.2.5.1. Maitrise des risques

En plus des critères de fiabilité, le biologiste doit s'assurer de la maitrise des différentes phases qui séparent le prélèvement (dont il est responsable) du rendu du résultat. Certaines d'entre elles sont dites critiques car elles peuvent introduire des erreurs. Ces points critiques doivent être identifiés et maitrisés. L'approche recommandée pour ne pas omettre d'étape est celle dites des « 5M » (Matière, Milieu, Matériel, Méthode, Main d'œuvre)

La partie « Matière » correspond au prélèvement : à sa nature (sang ou urine), au type de conditionnement, à son identité, aux conditions de transport et de prétraitement.

La partie « Milieu » correspond à l'environnement analytique, c'est-à-dire aux conditions de travail. Il est principalement question des températures de conservations des échantillons, des réactifs et des conditions ambiantes pour un déroulement optimal des analyses.

La partie « Matériel » décrit les outils : les analyseurs, leurs maintenances et leurs planifications, le mode de reconstitution des réactifs et des calibrants.

La partie « Méthode » décrit les limites de la méthode, les risques de contaminations et d'interférence ainsi que les causes d'incertitudes de mesure.

La partie « Main d'œuvre » correspond à l'acquisition et à l'entretien des compétences du personnel.

I.2.5.2. Evaluation du délai de rendu et respect du contrat :

Avant d'étudier le nombre de retards et d'identifier l'imputabilité des différentes phases (pré-analytique, analytique et post analytique) nous avons évalué les durées médianes séparant la réception de l'enregistrement, l'enregistrement de la vérification technique et la vérification technique de la validation biologique. Ces valeurs nous ont servi à définir l'heure maximale pour chaque phase au-delà de laquelle le risque de rendre les résultats après 11 heures était trop grand. Chaque étape a pu être évaluée grâce à une extraction des heures d'horodatage, d'enregistrement, de vérification technique et de validation biologique. L'analyse est faite sur une période de 3 mois, de Février à Avril 2014 inclus pour les analyses du Centaur XP et de Février à Avril 2015 inclus pour les analyses faites sur les Dimensions Vista. Le travail porte sur les différentes étapes du processus, depuis la réception jusqu'à la validation biologique. Les critères retenus sont présentés dans le tableau 4. Le délai de rendu est exprimé en médiane, 10^{ème} et 90^{ème} percentile. Seuls les bilans arrivés avant 9 h 15 sont considérés dans cette étude.

La cause sera ...	Phase pré-analytique (réception, enregistrement)	Si les résultats sont rendus après 11 heures et que ...	Enregistrement après 9h45 et durée de la phase analytique ≤ 1 heure
	Phase analytique (convoyage, centrifugation, analyse et validation technique)		Validation technique après 10h50 et enregistrement avant 9h45
	Post analytique (validation biologique)		Validation technique avant 10h50
	Mixte (pré analytique et analytique)		Enregistrement après 9h45 et durée de la phase analytique > 1 heure

Tableau 4 : Définition des critères pour l'analyse des retards

Les retards sont exprimés en nombre de bilans rendus après 11 heures.

Par ailleurs, nous avons étudié les moyens mis en œuvre pour prévenir le service de procréation médicalement assistée en vérifiant, à chaque fois qu'un retard était identifié, si une communication avait été faite au service et si l'information était tracée.

I.2.6. Traitement des données :

Les résultats des sérums de contrôle interne de qualité fournis pour la société Biorad sont gérés à l'aide du logiciel Unity Real Time (de Biorad). Les données des EEQ sont traitées par l'association ProBioQual. Les autres données sont traitées à l'aide du logiciel Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Pour les analyses statistiques, la normalité des distributions est évaluée à l'aide du test de Kolmogorov-Smirnov. En cas de distribution normale, les tests paramétriques utilisés sont l'ANOVA pour les variances et le test de *t de Student* pour les moyennes. Lorsque la distribution n'est pas Normale, les moyennes sont comparées par un test de Mann et Whitney. Les calculs statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel en ligne biostaTGV©. Les résultats sont traités par l'algorithme A qui permet de recalculer la moyenne et l'écart type de la distribution en corrigeant les valeurs extrêmes (23).

I.3. Résultats

I.3.1. Vérification sur site :

La vérification s'est déroulée sur 2 mois entre le 01/12/2014 et le 26/01/2015

I.3.1.1. Paramètres de fiabilité :

Précision :

Les CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire pour chaque hormone sont présentés respectivement dans les tableaux 5 et 6. Les moyennes des Vista indiquée correspondent aux moyennes des deux automates. Les données de RICOS souhaitables peuvent être converties en optimal (optimal = 0.5 x souhaitable) et en minimum (minimum = 1.5 x souhaitable). La répétabilité est mesurée sur une même série de mesure avec la même calibration. La fidélité intermédiaire est mesurée sur une période de 30 jours. Il y a eu 2 calibrations pour la LH et l'estradiol. Il y a eu 4 calibrations pour la progestérone. Les CIQ ont parfois été dosés le matin et le soir du même jour. Les lots de calibrateurs et de réactifs sont les mêmes sur la période de vérification.

Les calibrations permettent de corriger les dérives des résultats liées à la dégradation des réactifs. Cette dérive augmente le CV de fidélité intermédiaire. Elles peuvent cependant provoquer des biais. Il faut que les calibrations ne soit pas trop fréquentes.

Le CV de répétabilité de l'estradiol du Vista 3 est deux fois plus petit que celui du Vista 1 pour des concentrations de l'ordre de 20 pg/ml. Les résultats demeurent acceptables sur la base des données de la SFBC. Les valeurs de Ricos sont issues de la dernière mise à jour de 2014. Les résultats sont inférieurs aux limites optimales proposées par Ricos à l'exception du niveau 20 pg/ml de l'estradiol pour le Vista 3 qui respecte les limites souhaitables. Le Vista 1 ne respecte pas les valeurs minimales.

Paramètres (unité)	REPETABILITE			Références	
	Moyennes (N° du Niveau de contrôle)	VISTA		CV SFBC(24)	CV Ricos souhaitable
		CV Vista 1	CV Vista 3		
Estradiol pg/ml	(1) 20,0	17,2 %	8,7 %	18,8%	11,25 %
	(2) 316,6	NF	NF	7%	11,25 %
	(3) 736,8	1,6%	1,5%	7,5%	11,25 %
Progestérone ng/ml	(1) 1,18	3,6%	3,0%	18,8%	Absent
	(2) 8,0	1,5%	1,4%	7,5%	Absent
	(3) 19,5	1,2%	1,2%	7,5%	Absent
LH mUI/ml	(1) 4,25	2,4%	1,9%	7,5%	11,5 %
	(2) 20,7	1,5%	1,5%	6%	11,5 %
	(3) 76,3	1,6%	1,5%	6%	11,5 %

Tableau 5 : Coefficients de variation de répétabilité pour chaque hormone à l'issu des tests de vérification sur site ; NF : non fait ; N=30 ; Calcul réalisé pour une période de 2 mois.

Les CV de fidélité intermédiaire sont comparables pour toutes les hormones et tous les niveaux à l'exception des faibles concentrations d'estradiol. Le Vista 1 est en dehors des

limites acceptables avec les résultats de la vérification de méthode mais son CV est de 20% dans le mois qui a suivi. Pour la progestérone, le CV du Vista 1 est légèrement plus grand que celui du Vista 3.

Les résultats de fidélité intermédiaire sont stables après la vérification de méthode. Les RCV mensuels sont inférieurs à 1,2 au cours des 5 mois qui ont suivi.

Tableau 6 : Coefficients de variation de fidélité intermédiaire pour chaque hormone à l'issu des tests de vérification sur site. N=30 ; Calcul réalisé sur une période de 2 mois.

paramètres	FIDELITE INTERMEDIAIRE					Références		
	VISTA			CENTAUR XP		SFBC(2 4)	RICOS souhaitable	Pairs Vista
	Moyenne (N° du Niveau de contrôle)	Cv Vista 1	CV Vista 3	moyenne	CV			
Estradiol pg/ml	(1) 20,0	29%	13%	29,36	20, 6	25%	11,25%	21,1 %
	(2) 316,6	2%	2%	399,8	5,5	10%	11,25%	4%
	(3) 736,8	3%	2%	1062	5,0	10%	11,25%	3,4%
Progestérone ng/ml	(1) 1,18	7,8%	6,3%	0,89	21, 5	25%	Absent	7,1%
	(2) 8,0	2,8%	3,1%	6,79	11, 3	10%	Absent	3,1%
	(3) 19,5	2,9%	1,9%	16,32	12, 2	10%	Absent	3,6%
LH mUI/ml	(1) 4,25	2,3%	3,1%	4,57	6,1	10%	11,5 %	4,3%
	(2) 20,7	1,8%	2,4%	19,06	5,9	8%	11,5 %	3,3%
	(3) 76,3	1,8%	1,7%	67,16	6,6	8%	11,5 %	3%

Les concentrations obtenues sont dans les intervalles d'acceptation données par le fournisseur des échantillons de contrôle.

Les contrôles préparés au laboratoire ont permis de calculer les coefficients de variations pour des valeurs de 50 pg/ml (niveau bas) et 3000 pg/ml (niveau haut). Pour le niveau bas, ils sont respectivement de 10,7 % (Vista 1) et 6,6 % (Vista 3). Ces résultats sont calculés sur 25 passages. Le contrôle niveau haut a montré qu'il existait une différence moyenne de 400 pg/ml entre le Vista 1 et le Vista 3. Cette différence a été corrigée après une intervention technique (changement de l'aiguille de prélèvement et du mixeur qui homogénéise le milieu réactionnel). Le coefficient de variation après intervention est passé de 10% à 3.2% (valeur identique au Vista3).

La fréquence recommandée des calibrations par les fournisseurs pour la progestérone augmente la consommation des réactifs et peut contribuer à la dégradation des performances analytiques des Vista. Nous avons évalué la possibilité d’allonger la période de validité des calibrations en comparant les CV de chaque niveaux de CIQ sur une même période avec et sans calibration hebdomadaire.

Les résultats des prolongations des périodes de calibrations sont présentés dans les tableaux 7 et 8. Il n’y a pas de différence significative entre la période avec calibration hebdomadaire et la période avec une calibration unique ($p=0.227$). Les résultats après prolongation sont cependant tous légèrement plus bas. Une étude sur une période plus longue aurait peut-être montré une différence en faveur de l’allongement de la période entre deux calibrations.

	Niveau 1		Niveau 2		Niveau 3	
	Nb de contrôle	CV	Nb de contrôle	CV	Nb de contrôle	CV
calibration hebdomadaire	50	6,83	50	2,96	50	2,95
une seule calibration	49	5,82	54	2,86	48	2,13

Tableau 7 : Impact de la prolongation des période de validité des calibrations sur les CV de fidélité intermédiaire. CV et moyennes des résultats de progestérone sur le Vista 1 :

	Niveau 1		Niveau 2		Niveau 3	
	Nb de contrôle	CV	Nb de contrôle	CV	Nb de contrôle	CV
calibration hebdomadaire	50	5,63	50	2,01	50,00	2,18
une seule calibration	44	5,03	42	1,96	43	1,58

Tableau 8 : Impact de la prolongation des période de validité des calibrations sur les CV de fidélité intermédiaire. CV et moyennes des résultats de progestérone sur le vista 3 :

Les performances de la méthode ne sont pas dégradées par l’espacement des calibrations

Justesse et exactitude

Les résultats peuvent être précis mais faux. Pour évaluer l'éloignement à la valeur « vraie » nous étudions la justesse et l'exactitude. La valeur cible n'est pas toujours connue. Elle existe pour certaines molécules. Par exemple les résultats de progestérone obtenus à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse sont considérés comme des valeurs de référence. Lorsqu'elle n'est pas connue, elle est souvent assimilée à la moyenne des résultats obtenus par les mêmes analyseurs utilisant la même méthode de dosage.

La justesse évalue l'écartement de la moyenne d'un analyseur à une moyenne de référence. L'exactitude évalue l'écartement d'un résultat à une moyenne de référence.

Les biais de justesse sont évalués par les CIQ. Ils sont exprimés en pourcentage par rapport à la moyenne des pairs. Le tableau 9 présente les résultats obtenus. Les valeurs des concentrations présentées correspondent aux moyennes des pairs cumulés à la fin du mois de janvier 2015. Le nombre de valeur des pairs est supérieur à 1000 dans tous les cas. Les résultats montrent que les biais sont faibles et acceptables au regard des références proposées par les sociétés savantes et Ricos, à l'exception du niveau bas de l'estradiol sur le Vista 1. Les biais sont négatifs pour les deux Vista pour l'estradiol et la progestérone. Ils sont positifs et croissants avec la concentration pour la LH.

Les écarts sont faibles et de même sens pour les deux analyseurs. Ces résultats doivent être étudiés sur une période plus longue pour voir s'ils persistent.

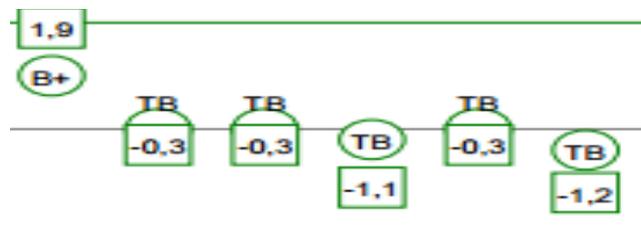
paramètres	Moyenne cumulée des pairs (nombre de laboratoires)	Biais V1 vs pairs	Biais V3 vs pairs	Limites SFBC	Limites Ricos souhaitable
Estradiol	24 pg/ml (22)	-32,8 %	-5,06 %	24,5 %	8,3 %
	325,2 pg/ml (8)	-2,6 %	-2,74 %	11,2 %	8,3 %
	753,1 pg/ml (14)	-3,2 %	-1,29 %	11,2 %	8,3 %
Progestérone	1,22 ng/ml(14)	-8,13 %	-6,5 %	24,5 %	ND
	8,0 ng/ml (10)	-2,12 %	-1,11 %	11,2 %	ND
	19,8 ng/ml (14)	-2,3 %	-1,81 %	11,2 %	ND
LH	4,16 UI/L (32)	0,4 %	0 %	17,3 %	8,9 %
	20,4 UI/L (17)	0,8 %	0,3 %	12,7 %	8,9 %
	75.2 UI/L (28)	2,6 %	0.7 %	12,7 %	8,9 %

Tableau 9 : Comparaison des biais de justesse de l'estradiol, de la LH et de la Progestérone pour le Vista 1 et le Vista 3. ND : Non Déterminé.

Après 5 mois d'utilisation les caractéristiques décrites après la vérification sur site sont restées stables. Les IET sont toujours compris entre +1,2 et -1,2 à l'exception du mois de janvier sur le Vista 1 où l'IET est de -1,9 pour l'estradiol. Cet écart est secondaire à une calibration.

Les résultats d'exactitude sont évalués à l'aide des EEQ. Nous avons analysé 6 sérums lyophilisés au cours de la période d'étude. La progestérone en technique LOCI est récente. Les résultats d'estradiol sont comparés avec 17 laboratoires et ceux de la LH avec 22 laboratoires. Il n'y a pas suffisamment de pairs pour la progestérone. Les autres résultats d'estradiol ainsi que tous les résultats de LH sont compris dans les intervalles d'acceptations définis par ProBioQual. Ces intervalles sont basés sur les données de « Ricos souhaitable » ou « minimum ». La figure 2 montre un exemple de présentation des résultats des EEQ suivi sur la période de 5 mois après la vérification de méthode. Les chiffres correspondent aux z-score et les lettres à la note. Les lignes supérieures et inférieures correspondent aux limites d'acceptation.

Figure 2 : Suivi des notes et z-scores par rapport au groupe de pairs : données issues des comptes rendu de ProBioQual : B+ = bien,-dans l'intervalle d'acceptation ; TB :=très bien, très proche de la moyenne de référence.



Les résultats sont satisfaisants.

I.3.2. Evaluation de l'incertitude de mesure

Les résultats des trois approches de calcul des incertitudes de mesures sont présentés dans le tableau 10. Les résultats des Vista 1 et 3 ont été regroupés. Cette incertitude représente ainsi « l'incertitude du laboratoire » pour les paramètres de fertilité. Les valeurs présentées sont les incertitudes élargies avec un coefficient d'élargissement k égale à 2. Le niveau d'incertitude est influencé par la méthode de calcul utilisée. L'incertitude est plus grande avec la méthode « CIQ+EEQ ». Les différences sont plus marquées avec les niveaux 2 et 3 d'estradiol (320 pg/ml et 750 pg/ml). La méthode « CIQ+étalon fournisseur » donne une incertitude très proche de la méthode « CIQ + CIQ externalisé ».

Tableau 10 : Incertitudes de mesure des 3 paramètres estradiol, LH et progestérone 5 mois après la vérification de méthode.

analyseurs	VISTA			CENTAUR XP
paramètre	Incertitude CIQ + Etalon fournisseur (k=2) Moyenne +/- incertitude de mesure (incertitude relative)	Incertitude CIQ+EEQ (k=2) Moyenne +/- incertitude de mesure (incertitude relative)	Incertitudes CIQ+ CIQ externalisés (k=2) Moyenne +/- incertitude de mesure (incertitude relative)	Incertitudes Centaur XP Méthode CIQ+EEQ élargie (k=2)
Estradiol (pg/ml)	22,5 ± 10,9 (48,3%)	21,1 +/-10,5 (49,6%)	25,1 ±10,0 (40,1%)	57,5± 14,6 (25,3%)
	323,8 ± 21,7 (6,7%)	328,8 +/-37,6 (11,4%)	325,0 ± 23,3 (7,2%)	399,9 ±40,9 (10,2%)
	754,0 ± 49,2 (6,5%)	757,2 +/- 76,9(10,2%)	761,0 ± 50,7 (6,7%)	982,6 ±83,8 (8,5%)
LH (mUI/ml)	4,14 ± 0,4 (9,8%)	4,17 ± 0,47 (11,4%)	4,15 ± 0,31 (7,5%)	4,85± 0,52 (10,7%)
	20,3 ± 1,2 (6%)	20,4 ± 1,48 (7,3%)	20,36 ± 1,13 (5,5%)	19,41± 2,30 (11,8%)
	75,2 ± 4,4 (5,8%)	74,9 ±5,9 (7,9%)	74,96 ± 4,77 (6,4%)	62,3± 11,72 (18,8%)
Progestérone (ng/ml)	1,14 ± 0,15 (13,5%)	Pas assez de données	1,16 ± 0,13 (13,7%)	0,89± 0,41 (45,9%)
	7,9 ± 0,5 (6,3%)	Pas assez de données	7,9 ± 0,41 (5,2%)	9,31 ±1,26 (13,6%)
	19,3 ± 1,12 (5,8%)	Pas assez de données	19,3 ± 0,87 (4,5%)	16,3 ±2,58 (15,8%)

I.3.3. Comparaison des méthodes :

I.3.3.1. Conditions d'analyses :

Les caractéristiques techniques représentées dans le tableau 11 indiquent que les volumes requis pour les analyses avec la nouvelle méthode ont été fortement réduits. La durée des analyses a été divisée par deux sauf pour la progestérone pour laquelle la durée n'a pas changé. Les limites hautes de dosages sont plus faibles avec les méthodes Vista et les limites de détections n'ont pas changées.

	paramètres	Vista	Centaur
Volume d'échantillon distribué (volume mort) μL	Estradiol	12	80
	Progestérone	10	20
	LH	2	50
Durée d'analyse	Estradiol	10	20
	Progestérone	21	18
	LH	10	20
Domaine de mesure	Estradiol	11-1500 pg/ml	11-3000pg/ml
	Progestérone	0.2-40 ng/L	0.2-60 ng/L
	LH	0.2-150 mUI/ml	0.2-200 mUI/ml

Tableau 11 : Comparaison des conditions de dosages entre le Dimension VISTA et le Centaur XP

Les informations des fiches techniques indiquent que la limite de quantification est la même pour l'estradiol (19 gp/ml avec la technique CMIA™ et 18.7 pg/ml pour la technique LOCI™) (20). Pour la progestérone, nous ne connaissons que la limite de quantification de la méthode Vista (0.5 ng/ml). Pour la LH, seule la limite de détection est précisée. Elle est de 0,2 mUI/ml (25).

I.3.3.2. Comparaison des résultats :

Cette analyse est faite en trois parties :

- La comparaison des moyennes et des coefficients de variations obtenus avec les résultats des CIQ du lot 40850 qui ont été passés sur les deux analyseurs.

- L'étude des corrélations entre analyseurs est faite à l'aide d'un diagramme de dispersion. Il représente les résultats rendus par chacun des analyseurs pour un même sérum. L'analyse de l'équation de la droite (ou de la courbe) des tendances indique et quantifie le biais existant entre les deux automates. La valeur du coefficient de régression R mesure la dispersion des résultats.

- L'étude du diagramme des différences entre les résultats. Elle permet de voir si un analyseur donne des valeurs plus hautes ou plus basses que l'autre et si ces différences sont stables en fonction des concentrations. Le graphique est centré sur l'équation $y = 0$. Si les points sont répartis de manière uniforme de part et d'autre de l'axe des abscisses, les méthodes sont équivalentes. Sinon, il existe un biais systématique.

Le nombre de sérums et la gamme de concentrations couverte au cours de cette étude sont présentés dans le tableau 12. Six prélèvements de femmes enceintes ont été rajoutés.

Paramètres	Nombre de sérum	Gamme de concentration
Estradiol	42	26,13- 1200 pg/ml
Progestérone	32	1,2-60,5 ng/ml
LH	36	0,4-28,6 mUI/ml

Tableau 12 : Gamme des concentrations testées pour la comparaison de méthode

Les corrélations de l'estradiol, de la LH et de la progestérone sont présentées respectivement sur les figures 2, 4 et 6. Les diagrammes de différence sont présentés sur les figures 3, 5 et 7.

Comparaison entre Vista et Centaur :

Les moyennes des niveaux 1, 2 et 3 des CIQ de l'estradiol du Centaur sont respectivement plus hautes de 41,5%, 20% et 44,3%. Pour la progestérone, les résultats du Centaur sont plus bas respectivement de 32, 5%, 18% et 20 % pour les niveaux 1,2 et 3. Les concentrations des niveaux 1 et 2 de la LH sont similaires. Il existe un biais de 12 % avec le niveau 3 pour lequel le Centaur est plus bas.

Tous les CV de fidélité intermédiaires des Vista sont plus faibles que ceux du Centaur XP. Ils ont été réduits de moitié pour la LH et les niveaux 2 et 3 pour l'estradiol et d'un

facteur 3 à 6 pour la progestérone. Seul le niveau 1 d'estradiol du Vista 1 apparait plus variable que le Centaur.

Les incertitudes de mesures du Vista sont plus basses que celle du Centaur XP pour la LH. Pour les niveaux 320 et 750 pg/ml d'estradiol, la différence est faible. Il n'est pas possible de conclure pour les faibles concentrations d'estradiol car le niveau bas du Centaur XP n'est pas le même que celui du Vista (57 pg/ml vs 22 pg/ml).

La corrélation montre que les résultats du Vista sont plus bas de 20 % par rapport au Centaur XP pour l'estradiol et plus haut de 10 % pour la progestérone. La concordance est très bonne pour la LH. Un point sur les trente sort significativement des limites de suivi ce qui est acceptable pour l'estradiol. Aucun n'est en dehors des limites de suivi pour la LH et la progestérone.

Les diagrammes des différences confirment les biais calculés sur la base des équations de régressions. Deux points sortent des limites de suivi pour l'estradiol. Tous les points sont acceptables pour le LH et la progestérone.

Comparaison entre les deux Vista :

Les CIQ montrent qu'il existe un biais pour l'estradiol respectivement de 24%, 2.4 % et 2.3 % pour chaque niveau. Le Vista 1 donne des résultats plus bas (16,6 pg/ml contre 23,5pg/ml). Cette différence est acceptable sur le plan clinique. Pour tous les niveaux de concentration de LH et de progestérone, les moyennes obtenues pour chaque Vista sont similaires.

Les corrélations entre Vista 1 et 3 sont satisfaisantes. Tous les points, quel que soit le paramètre, sont dans les limites de suivi. Les deux automates sont concordants. En revanche, il existe un biais de 5 % pour l'estradiol sur la base de l'équation de régression. Le Vista 1 donne des valeurs plus basses.

Les diagrammes de différences ne font pas ressortir de biais. Tous les points sont dans les limites de suivi.

Comparaison entre Centaur XP et CP :

Les CIQ montrent des biais négligeables pour les LH et la progestérone. Tous sont inférieurs à 5%. Les biais sont plus importants avec l'estradiol (4%, 13,8% et 10,2% respectivement pour des concentrations de 59 pg/ml, 463 pg/ml et 1000 pg/ml).

La corrélation entre Centaur XP et CP montre que le Centaur CP rend des résultats plus hauts de 28% pour l'estradiol et de 5% pour la LH. Le Centaur XP donne des valeurs plus hautes de 8% pour la progestérone.

Le diagramme des différences, ne montre pas de biais avec l'estradiol mais les points sont dispersés. Il existe un biais systématique et proportionnel à la concentration pour la LH. Le Centaur CP donne des valeurs plus hautes de 10%. Près de 99% des points de progestérone sont compris entre 0 et 1,5 ng/ml. On ne met pas en évidence de biais mais la dispersion est importante.

En résumé, l'analyseur Vista et l'analyseur Centaur sont commutable. Les résultats ne sont pas équivalents mais il est possible de passer de l'un à l'autre avec un coefficient de correction. La concordance entre les deux analyseurs Vista s'avère meilleure que celle observée entre les deux Centaur. La nouvelle méthode donne des résultats plus satisfaisants (moins de dispersion et absence de biais entre les deux automates).

Figure 3 : Résultats des corrélations pour l'estradiol : Comparaison entre le Centaur XP et le Vista (a), entre les deux Vista (b) et entre le Centaur XP et le Centaur CP(c). Les lignes courbes correspondent aux limites de suivi ; limites de suivi = moyenne de fidélité intermédiaire $\pm \sigma$ (limite de suivi). N=30.

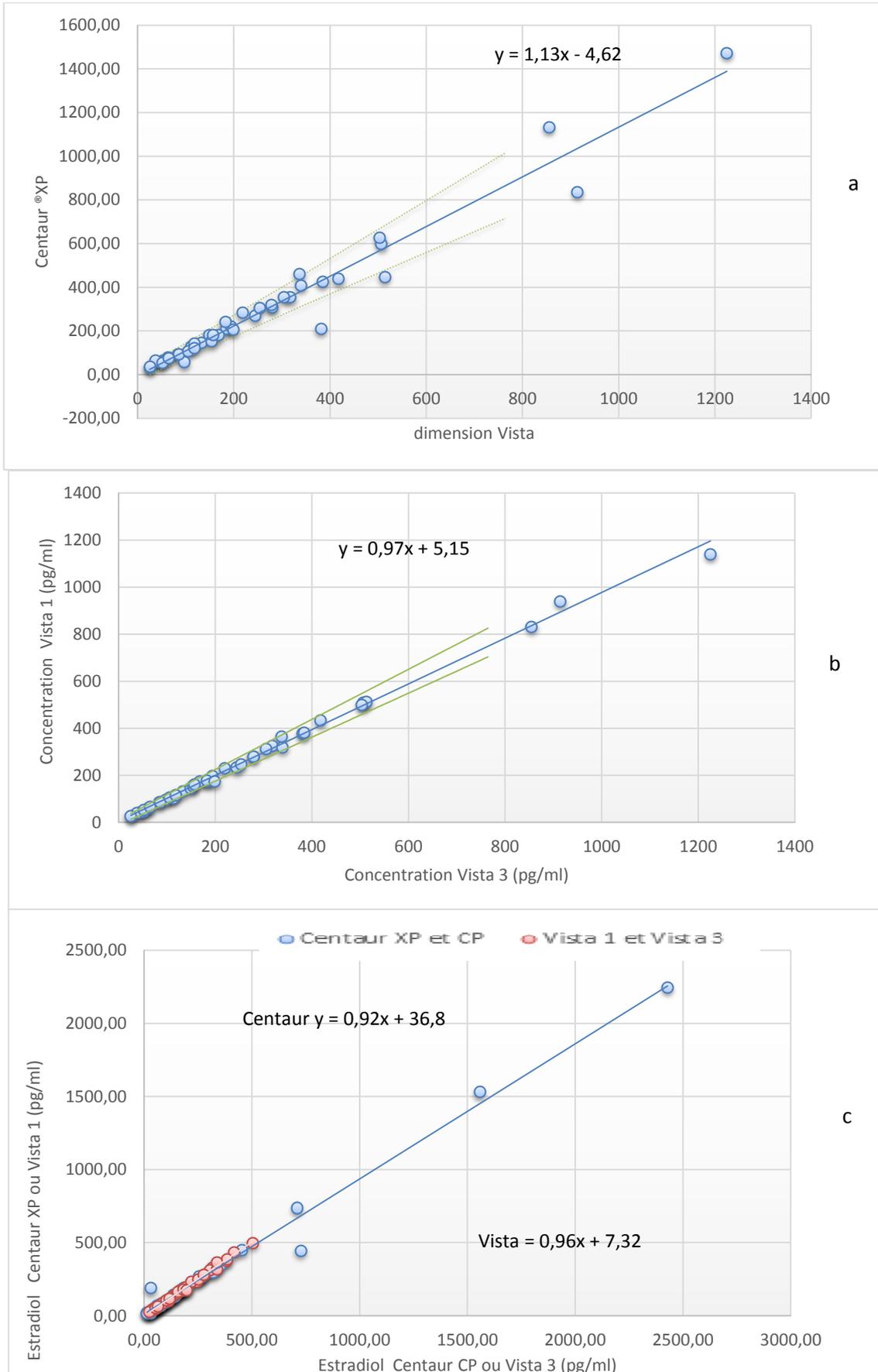


Figure 4 : Diagramme des différences pour l'estradiol : Comparaison entre le Centaur XP et le Vista (a), entre les deux Vista (b) et entre le Centaur XP et le Centaur CP (c). Les lignes courbes correspondent aux limites de suivi ; limites de suivi = moyenne de fidélité intermédiaire $\pm \sigma$ (limite de suivi). N=30

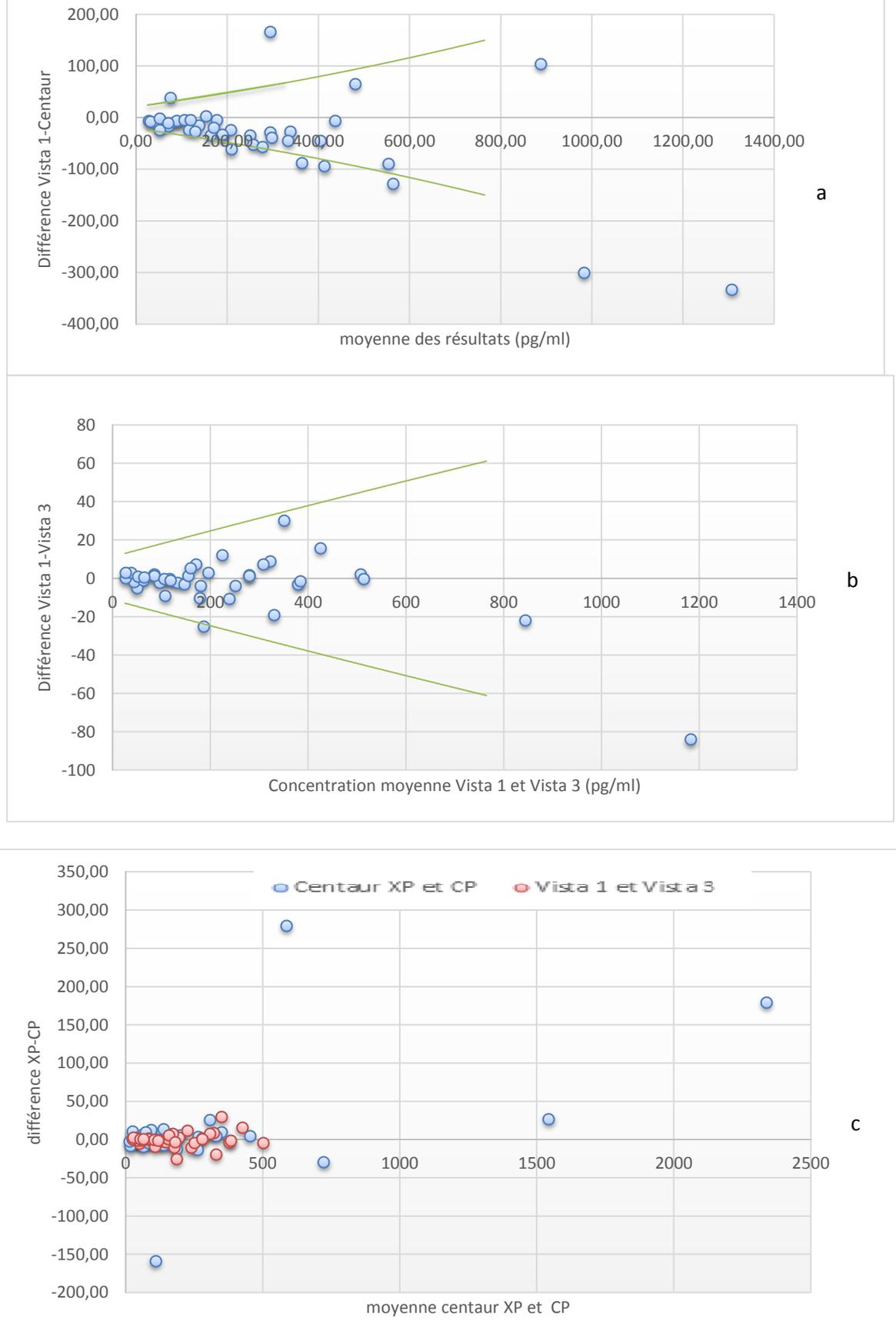


Figure 5 : Résultats des corrélations pour la LH : Comparaison entre le Centaur XP et le Vista (a), entre les deux Vista (b) et(c) entre le Centaur XP et le Centaur CP. Les lignes courbes correspondent aux limites de suivi ; limites de suivi =moyenne de fidélité intermédiaire $\pm \sigma$ (limite de suivi). N=30

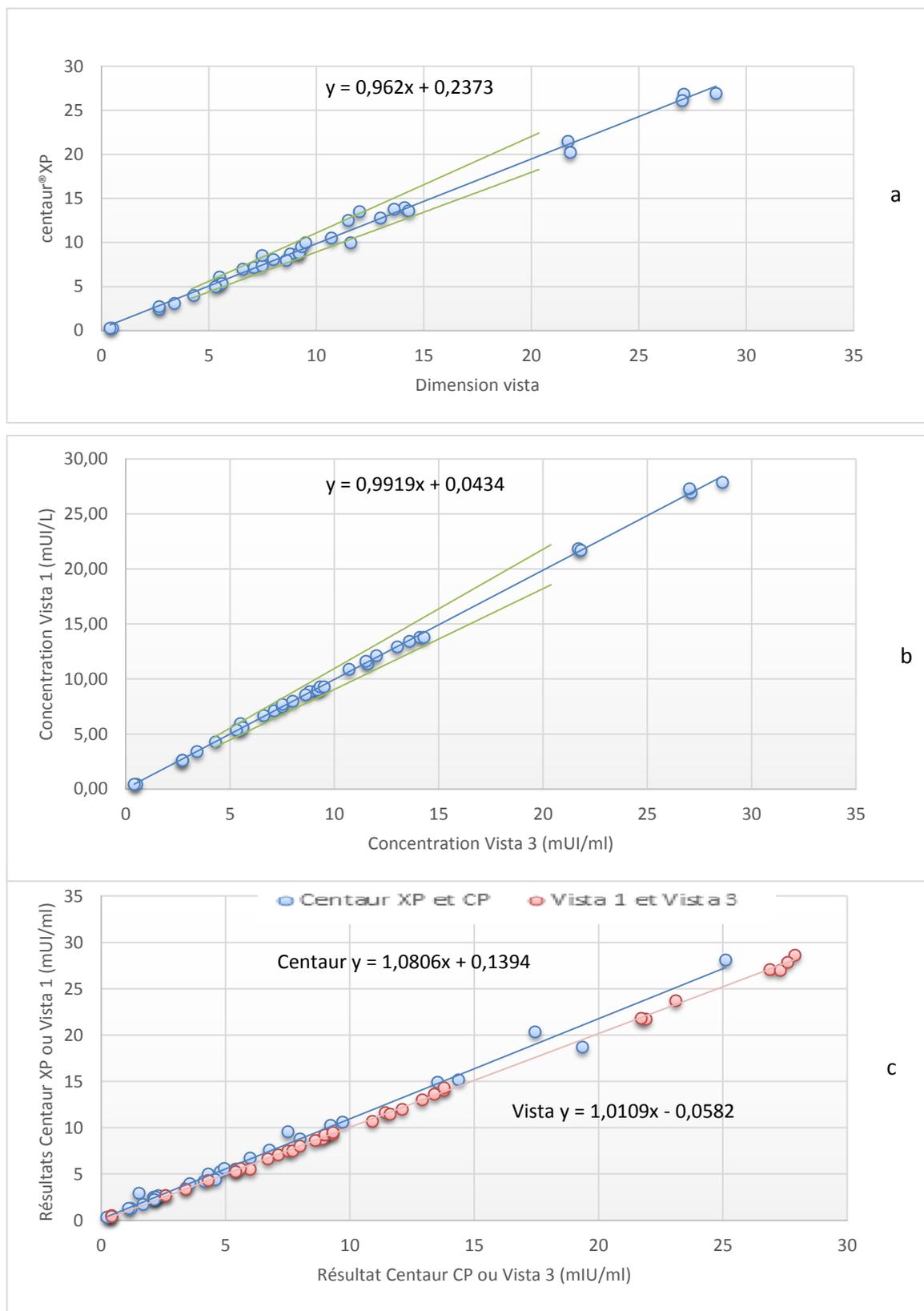


Figure 6 : Diagramme des différences pour la LH : Comparaison entre le Centaur XP et le Vista (a), entre les deux Vista (b) et entre le Centaur XP et le Centaur CP (c). Les lignes courbes correspondent aux limites de suivi ; limites de suivi =moyenne de fidélité intermédiaire $\pm \sigma$ (limite de suivi). N=30

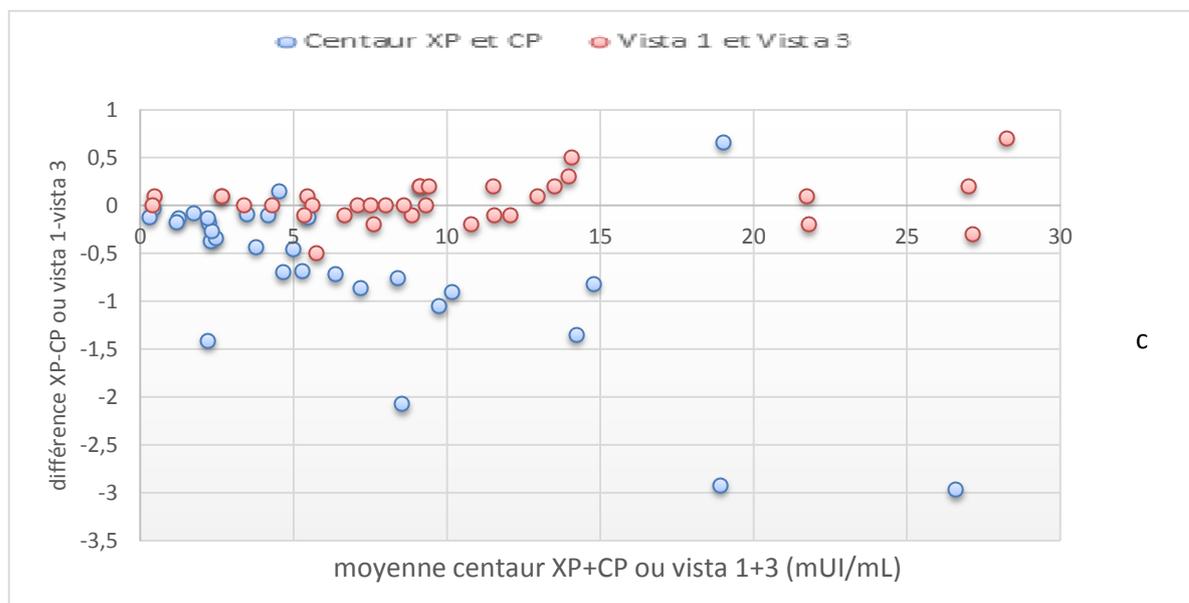
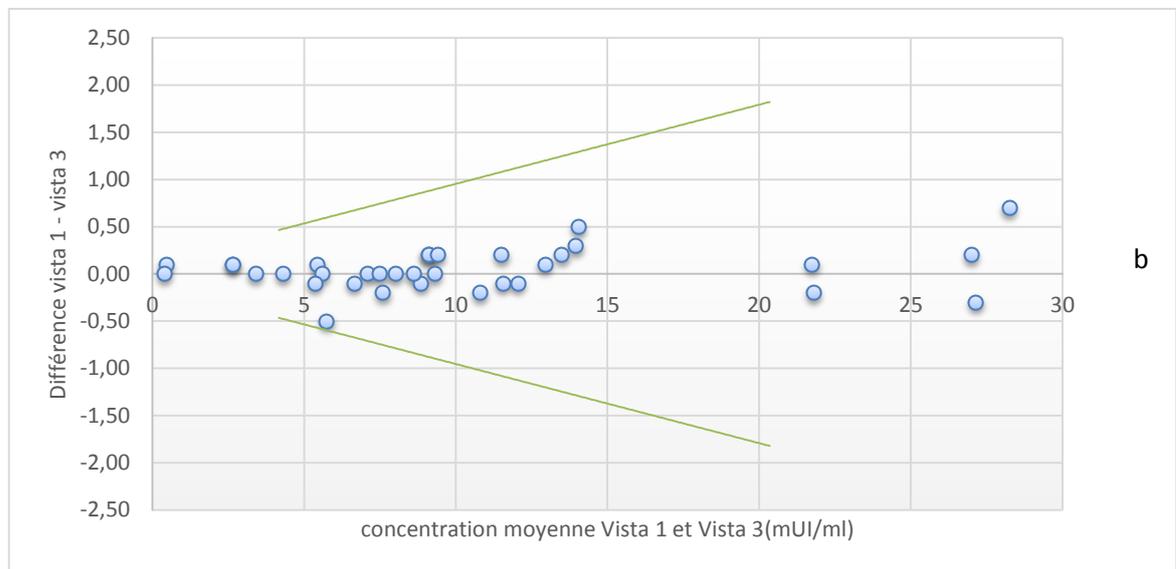
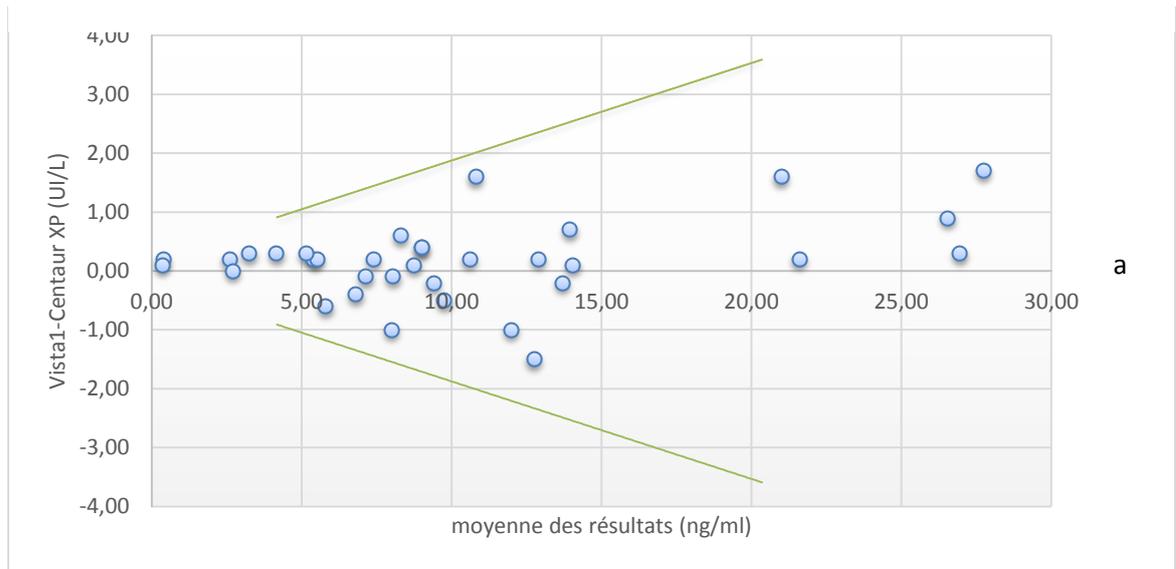


Figure 7 : Résultats des corrélations pour la progestérone : Comparaison entre le Centaur XP et le Vista 1 (a), entre les deux Vista (b) et entre le Centaur XP et le Centaur CP(c). Les lignes courbes correspondent aux limites de suivi ; limites de suivi =moyenne de fidélité intermédiaire ± σ (limite de suivi). N=30

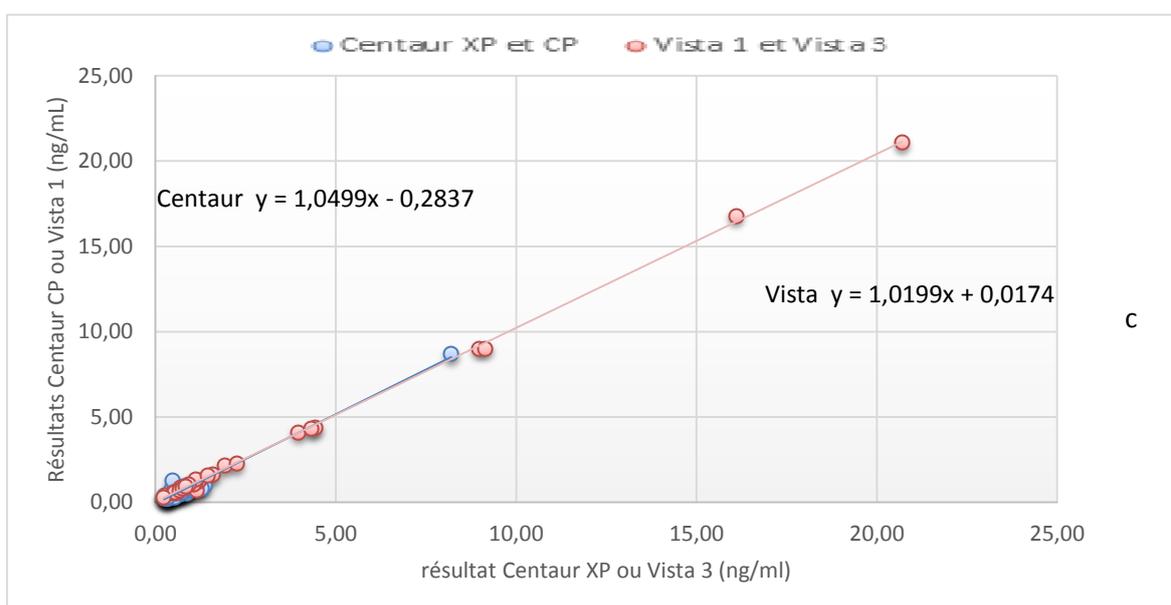
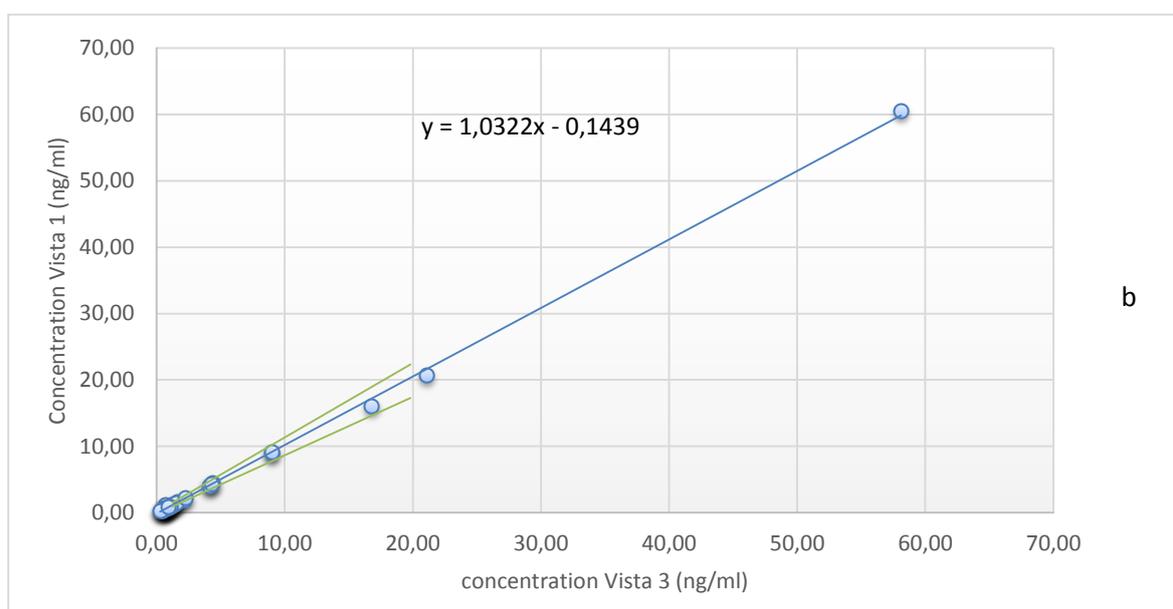
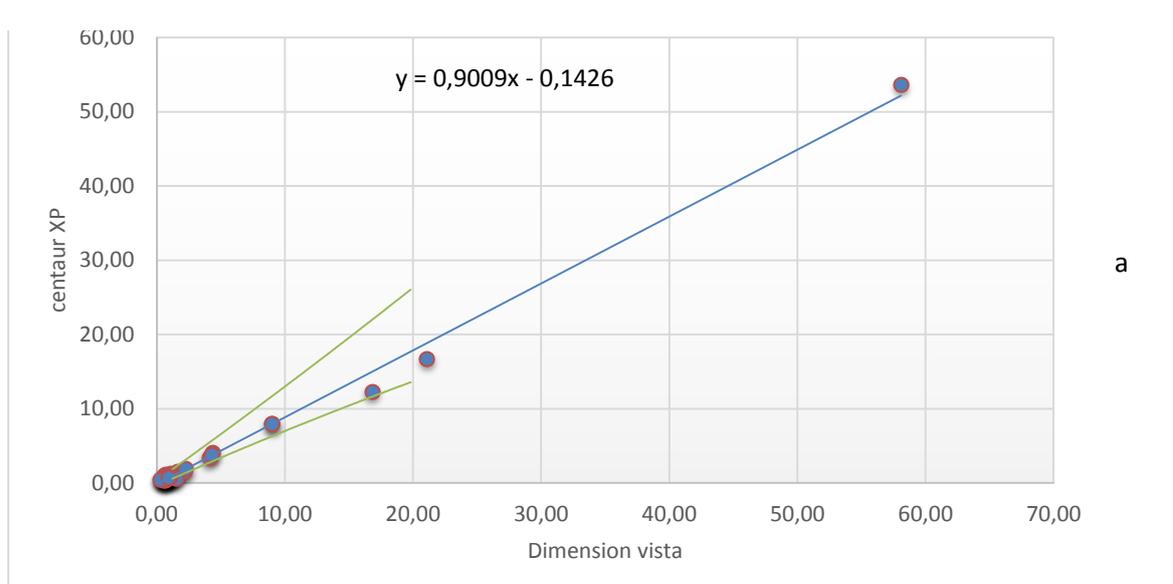
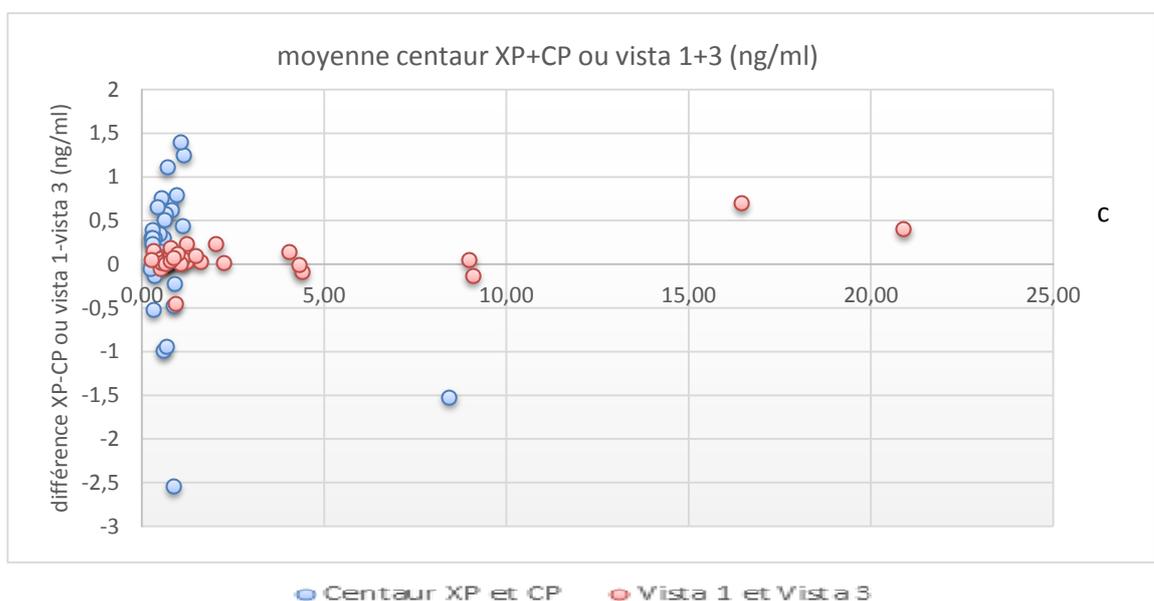
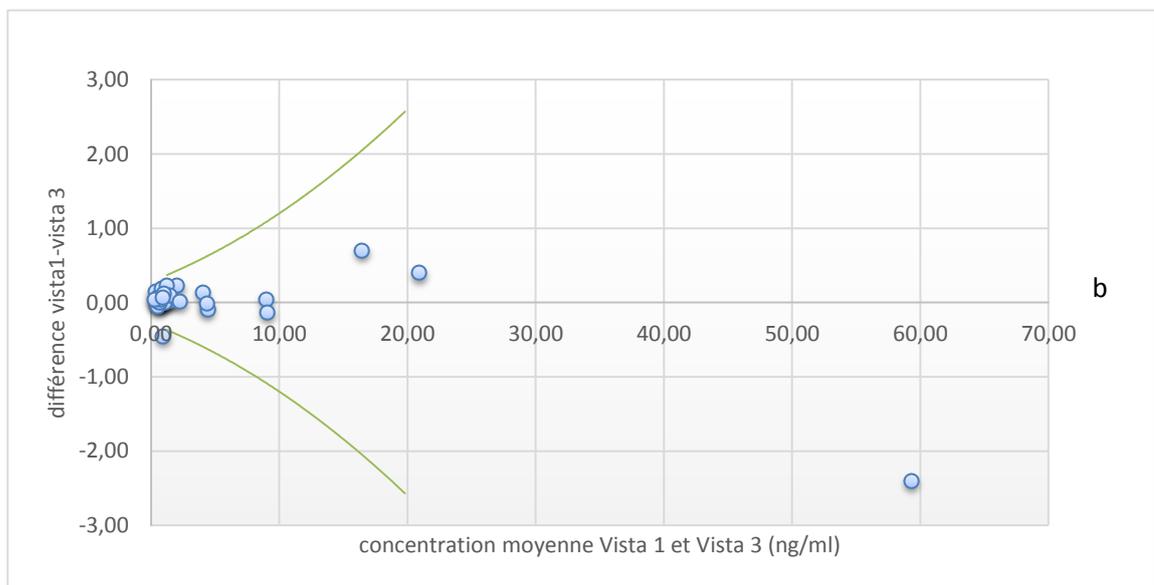
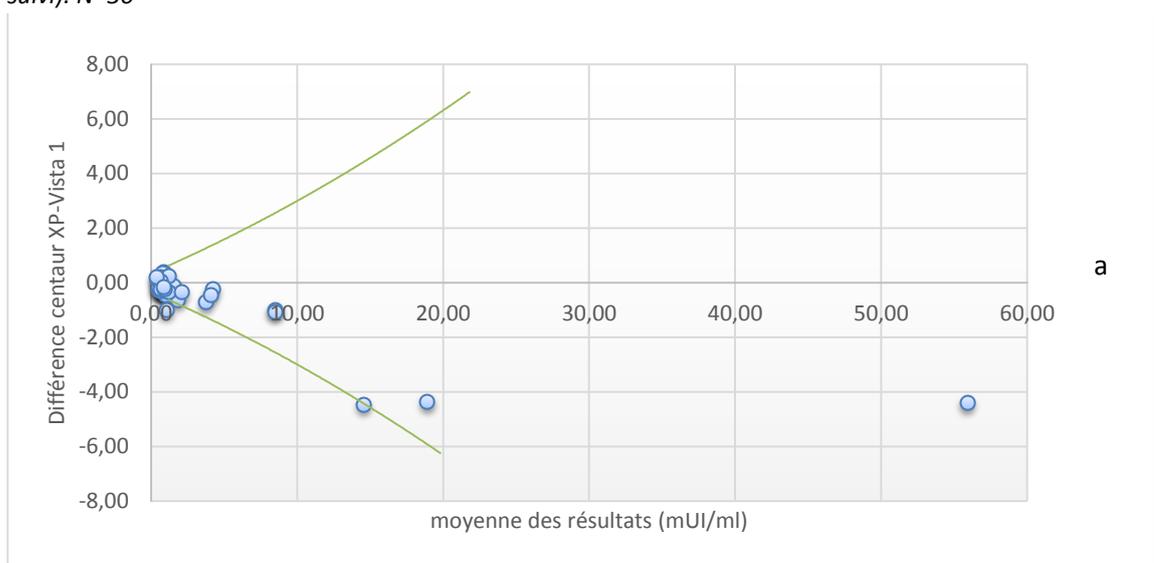


Figure 8 : Diagramme des différences pour la progestérone: Comparaison entre le Centaur XP et le Vista 1 (a), entre les deux Vista (b) et entre le Centaur XP et le Centaur CP (c). Les lignes courbes correspondent aux limites de suivi ; limites de suivi =moyenne de fidélité intermédiaire $\pm \sigma$ (limite de suivi). N=30



I.3.3.3. Comparaison aux autres techniques :

Les EEQ nous donnent des informations sur la reproductibilité inter-technique, c'est-à-dire sur la dispersion des résultats obtenus avec les différentes techniques participants au même programme d'évaluation externe de la qualité.

La figure 8 présente un exemple de diagrammes de Youden pour l'estradiol la LH et la progestérone pour deux niveaux d'EEQ. Les répartitions observées sur ces diagrammes sont comparables à celles observées avec les autres graphiques de Youden obtenus sur la période d'étude. Les diagrammes de Youden exploitent les résultats de deux niveaux de contrôle sur un graphique unique. L'abscisse représente le résultat du taux bas et l'ordonnée celui du taux élevé. Les limites acceptables de chaque niveau délimitent un carré ou un rectangle central. Ce dernier représente une aire d'acceptabilité des résultats. Lorsque les résultats sont en dehors mais sur la diagonale, la méthode présente un biais de justesse. Dans tous les autres cas, il y a un problème d'étalonnage ou de précision de la technique. La position de notre résultat sur ce graphique nous aide à dépister des anomalies techniques.

On observe un nuage de points assez dense pour l'estradiol et la LH alors qu'il est plus dispersé pour la progestérone. Ce nuage regroupe les résultats de techniques différentes. Plus le nuage est dense meilleure est la reproductibilité inter technique.

Pour l'estradiol, on peut distinguer 3 nuages. Le premier, central, regroupe la majorité des techniques. Il est composé principalement des résultats des analyseurs de la société Roche et Biomérieux. Un deuxième, excentré, mais sur la diagonale, présentant un biais de justesse composé des résultats Cisbio et de OrthoClinical diagnostic. Enfin, un troisième nuage excentré au-dessus du nuage principal.

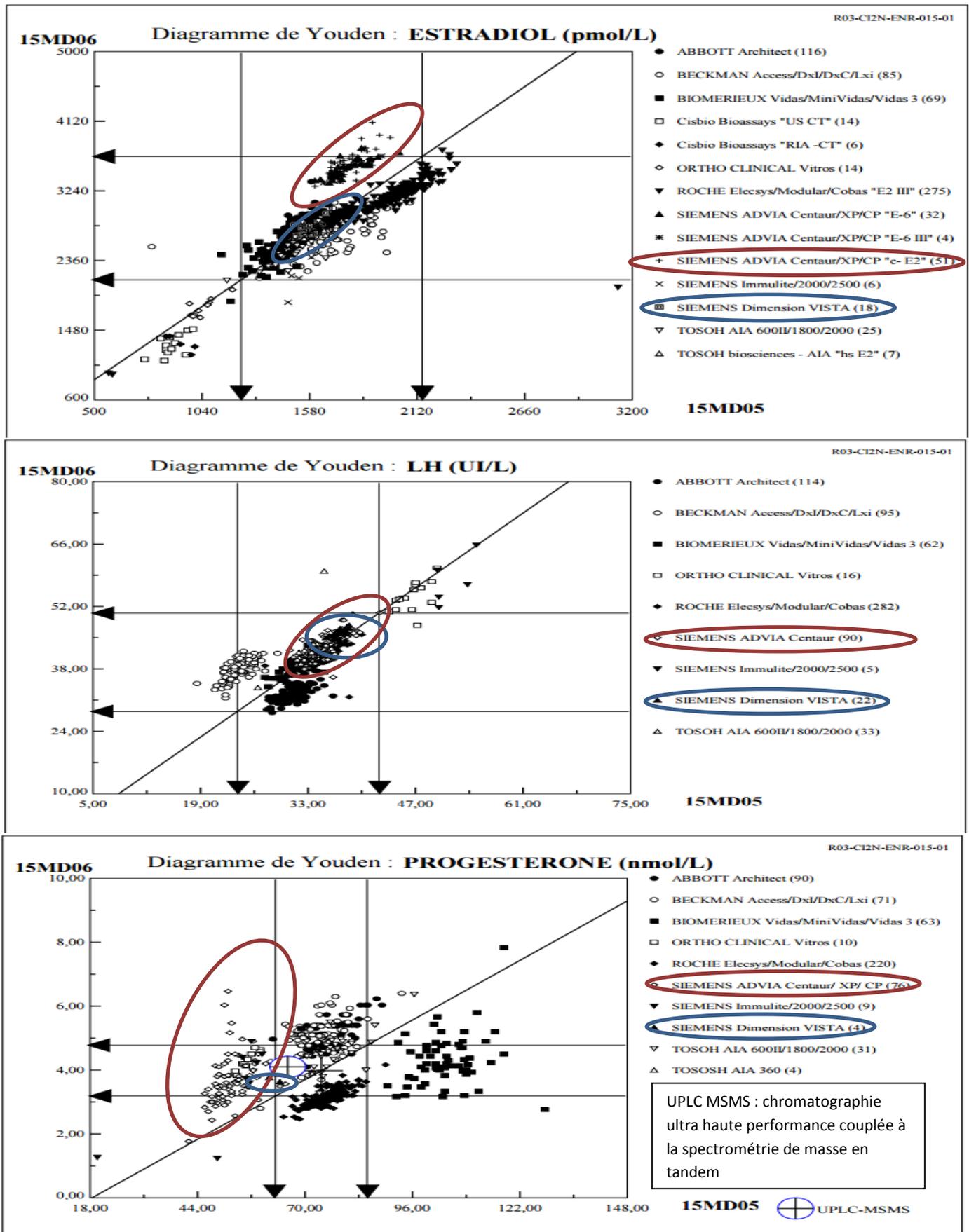
La méthode LOCI fait partie du nuage central. Les résultats apparaissent peu dispersés. La méthode du Centaur présente un biais d'étalonnage. La dispersion des points plus grande.

Le diagramme de la LH montre qu'il existe une très bonne reproductibilité inter-technique. Sur 7 répertoriées dans ce programme de probioqual, 5 sont regroupé dans le même nuage central. Les résultats du Centaur XP et du Vista sont superposables. Ceux du Centaur XP sont plus dispersés

La dispersion des nuages de la technique LOCI doit être nuancée à cause du faible nombre de laboratoires utilisant cette technique pour le moment.

Il n'y a pas assez de données pour la progestérone, notons simplement que les résultats de la méthode Vista sont très proches de la méthode de référence et que la dispersion des résultats du Centaur est importante.

Figure 9 : Diagramme de Youden de l'estradiol, de la LH et de la progestérone construit sur deux résultats d'EEQ.



I.3.3. Maitrise des risques et Impact de la nouvelle organisation sur les délais d'analyse :

Deux risques principaux ressortent de l'étude du processus : une panne simultanée des deux automates et une rupture de stock en réactifs, calibrants ou contrôles de qualité. La solution de repli est un laboratoire extérieur sur Grenoble.

Les délais de rendus pour chaque automate sont présentés dans le tableau 13. Ils sont comparables sur les deux périodes.

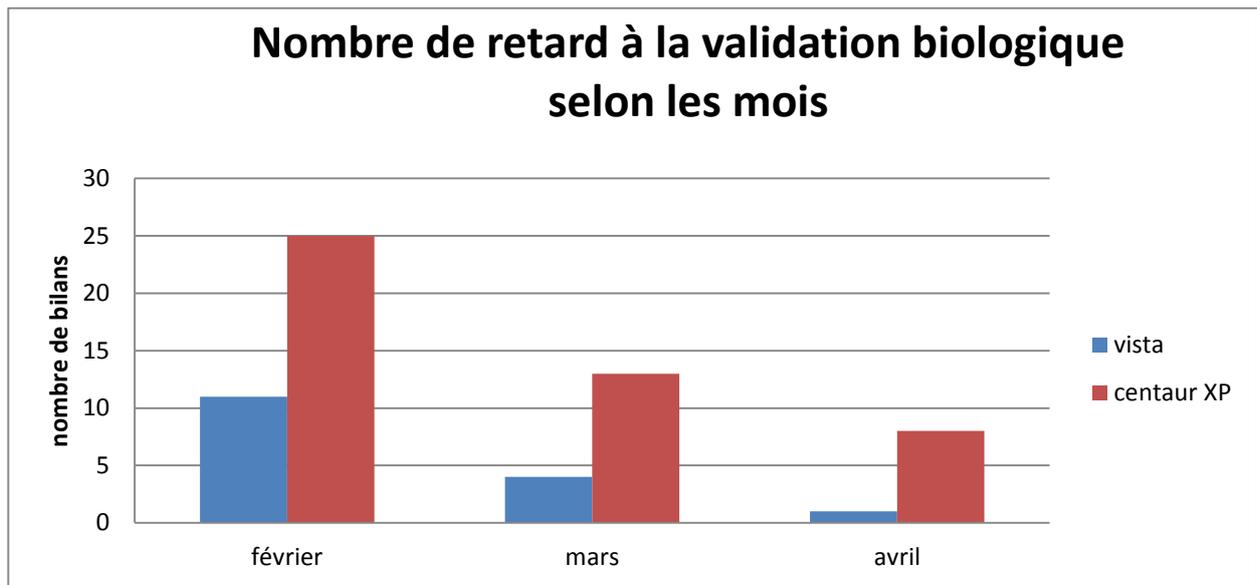
Automate	Centaur	Vista
Nombre de bilan	830	756
Période	01 février– 30 avril 2014	27 janvier -27 avril 2015
10ème centile	1 heure	1 heure
médiane	1 heure 16	1 heure 18
90ème centile	1 heure 50	1 heure 52

Tableau 13 : Comparaison des délais de rendu pour la période de février à avril en 2014 et 2015 (temps entre l'horodatage et la validation biologique)

Quatre-vingt-treize pourcent des demandes traitées au cours de la période entre février et avril 2014 sont arrivées avant 9h15. Il y a eu 45 bilans rendus après 11 heures, soit 6% des demandes. Parmi les demandes de la période de février à avril 2015, 96 % sont arrivées avant 9h15. Il y a eu 20 dossiers rendus après 11 heures, soit 3% des demandes. Le nombre de retard et leur importance est présenté sur la figure 9. La répartition des causes est présentée dans la figure 10.

Le nombre et la durée des retards ont été divisés par deux depuis le transfert des dosages sur les Vista. La répartition des causes n'a pas changée en proportion. Les causes « mixtes » ne sont pas retrouvées sur la période de 2015. Les raisons des retards (pannes, surcharge de travail, etc.) ne sont pas identifiables. Certains sont secondaires à une panne d'automate car tous les bilans de PMA du jour sont en retard et les contrôle de qualité sont passés tardivement. D'autres sont dispersés (1 à 3 par jours) et pourraient d'avantage être liés à une surcharge de travail ou à des oublis.

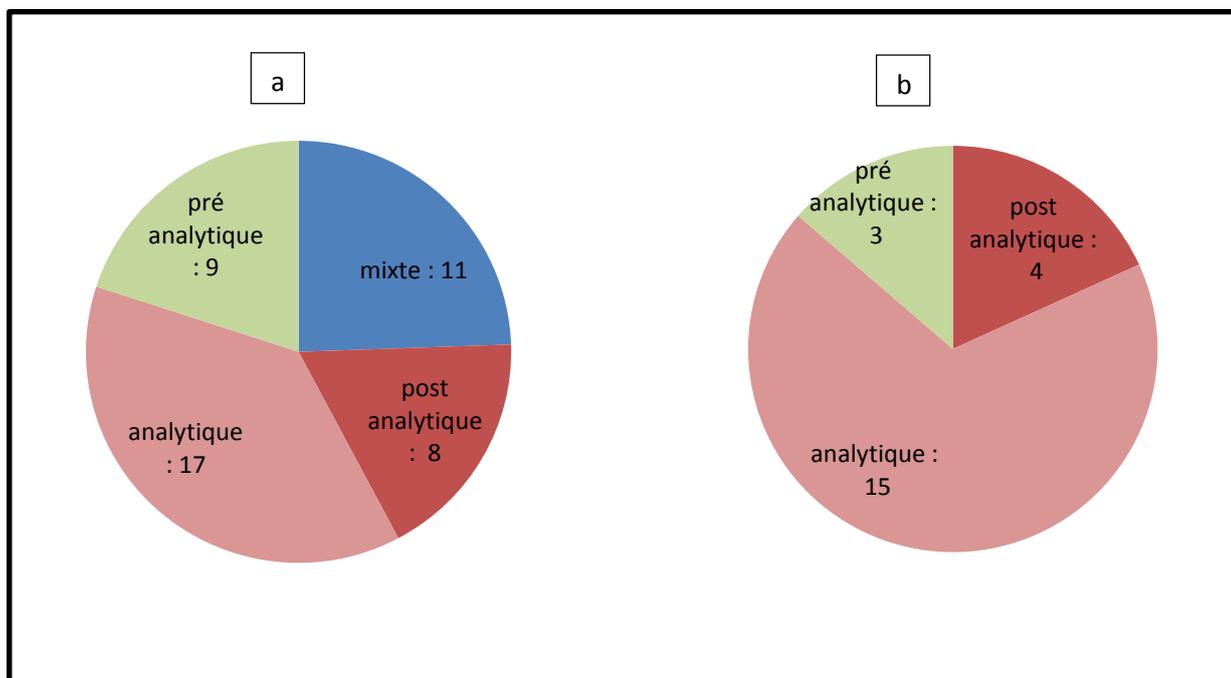
Les retards ne sont pas tracés. Ils n'ont pu être identifiés que par l'extraction de données informatique. De même, il n'y a aucune preuve du signalement des retards aux services de PMA.



Importance des retards		
Février-avril 2014 percentile)	médiane (10 ^{ème} -90 ^{ème})	1h16 (32 min- 1h50)
Février-avril 2015 percentile)	médiane (10 ^{ème} -90 ^{ème})	28 min (4 min- 1h08)

Figure 10 : Comparaison du nombre et de l'importance des retards.

Figure 11 : Répartition des causes de retard au cours de la période février-avril : (a) 2014; (b) 2015.



I.4. Discussion

I.4.1 Vérification sur site des nouvelles méthodes

I.4.1.1. Critères de fiabilité

La vérification sur site s'est avérée satisfaisante et autorise l'utilisation quotidienne de ces nouvelles méthodes.

Les CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire obtenus avec les nouvelles méthodes correspondent aux données fournisseurs exception faite pour les faibles concentrations d'estradiol et de progestérone qui sont plus hautes que celle indiquées sur les fiches techniques (respectivement 12.3% et 4.3 %). Cette variabilité n'est pas liée à la fluctuation de l'échantillonnage car les CV sont restés stables aux cours des 5 mois d'utilisation.

L'imprécision des trois niveaux de contrôle de chaque hormone est acceptable au regard des résultats de nos pairs. Les RCV sont restés inférieurs à 1,2.

La forte valeur de CV (29%) pour le niveau bas d'estradiol observée lors de la vérification de méthode s'explique par une calibration intervenue au milieu de la phase de test. Elle a provoqué une modification de la moyenne qui est passée de 19,8 pg/ml, sur une période de 15 jours, à 14 pg/ml sur une autre période de 15 jours. En ne considérant chaque période, les CV sont de 20% et 22%. L'annexe 2 illustre la conséquence de cette calibration. La différence observée entre les deux Vista pour ce niveau disparaît lorsque les concentrations augmentent. Elle est difficile à expliquer car les performances des autres analyses (LH et progestérone) sont comparables pour les deux analyseurs, et les systèmes de prélèvements et de mesures mis en œuvres sont les mêmes. Notons par ailleurs que les résultats des mois de juillet et août indiquent que les CV des Vista deviennent comparable. Le Vista 1 n'est pas moins performant que le Vista 3, tout dépend de la période d'étude.

Anne Vassault et ses collaborateurs ont proposé comme référence les CV de répétabilité et de reproductibilité obtenus par 50 % des laboratoires les plus performants en se basant sur des contrôles externes ponctuels ou permanents (24). Les résultats des Vista seraient satisfaisants selon ces critères. Cependant la limite choisie pour définir la performance est discutable (pourquoi 50% ?) et il n'y a pas de distinction entre les différentes méthodes utilisées. De plus, ces données datent de 1999, elles ne sont plus adaptées aux techniques actuelles.

Les références proposées par Carmen Ricos et ces collaborateurs sont basées sur la variabilité biologique inter et intra-individuelle. Elles sont construites sur la base des CV extraits d'une revue de la littérature. Il n'y a pas de données concernant la progestérone. Les CV de la LH et des niveaux 316,5 pg/ml et 736,8 pg/ml d'estradiol sont inférieurs niveau optimum (cf. tableau de l'introduction) ce qui témoigne d'une bonne performance analytique. Concernant le niveau 20 pg/ml de l'estradiol, le Vista 3 est inférieur au limite minimum mais le Vista 1 est hors limite. Les références proposées par Ricos sont cependant discutables. Il n'y a pas de distinction entre répétabilité et fidélité intermédiaire et cette approche ne tient pas compte des différences de fiabilité des méthodes en fonction des

niveaux de concentration. Les CV proposés sont issus de 5 articles pour la LH et 5 articles pour l'estradiol (26). Ils ne reflètent pas totalement la variabilité biologique des hormones. Par exemple, la concentration d'estradiol double toutes les 48 heures à partir du 6^{ème} jour de cycle. Les CV calculés dépendent du nombre de prélèvements par jour, du délai entre les prélèvements et du nombre de jours suivis. Il semble que la variabilité biologique ne soit pas l'approche la plus satisfaisante pour l'établissement de critères d'acceptation analytique pour ces molécules.

L'absence de différences significatives entre les CV de progestérone qu'il y ait ou non une calibration hebdomadaire indique que la fréquence des calibrations pourrait être repoussée à 1 mois sans altérer les performances analytiques de la méthode. Cela permettrait de réduire la consommation de réactif et de simplifier l'organisation du travail. La surveillance quotidienne des contrôles internes permettra de pallier à une éventuelle dérive.

Les résultats des CIQ obtenus lors de la vérification sur site nous ont permis de déterminer des limites d'acceptation globales. Nous avons défini la moyenne des 2 analyseurs comme moyenne de référence et nous avons choisi l'écart type des pairs comme unité de dispersion. Trois écart-types des pairs constituent les limites de tolérance. Sur la période de suivi, 832 CIQ ont été passés pour la LH, 932 pour la progestérone et 999 pour l'estradiol. Il y a eu respectivement 0,4 %, 0,6 % et 0,5% de rejet. Cette proportion est acceptable.

Les trois niveaux de CIQ nous donnent une information sur la variabilité pour la première moitié de la gamme de dosages. Les valeurs supérieures à 1500 pg/ml associées à une dilution ne sont pas testées. Il pourrait être utile de réaliser de manière ponctuelle un nouveau mélange de sérum.

La justesse des analyseurs est satisfaisante pour l'ensemble des paramètres. Elle est restée stable sur toute la durée de suivi. Le biais de -32 % observé lors de la vérification sur site correspond à -1,5 IET et s'explique, de la même manière que le CV de 29%, par la calibration intervenu au cours de la phase de test (cf. annexe 2). En dehors de ce cas, tous les IET sont dans l'intervalle fixé (± 1.2 écart-type de nos pairs). Les résultats sont acceptables lorsque l'on se compare aux limites proposées par Anne Vassault et aux limites souhaitables de Carmen Ricos. Ces biais observés peuvent s'expliquer par des différences de lots (de réactifs, de calibrants) et de calibrations.

Les résultats d'exactitudes de l'estradiol et de la LH sont satisfaisants. Ils sont dans les intervalles considérés comme acceptables par Probioqual. De plus, Les biais sont rapportés aux référentiels proposés par la SFBC (24). Dans le cas de la progestérone, les pairs ne sont pas assez nombreux pour faire une analyse rigoureuse.

Les incertitudes de mesures complètent les résultats biologiques en permettant de dire si deux dosages consécutifs sont significativement différents. Pour exemple, considérons que nous obtenons lors d'un premier dosage, un résultat de 20 pg/ml d'estradiol et que deux jours plus tard, un nouveau dosage pour la même patiente rend 30 pg/ml ; avec une incertitude de ± 11 pg/ml la probabilité pour que les 2 concentrations soient différentes est de 83%. Pour être de 95%, il faut que la concentration lors du deuxième prélèvement soit de 38 pg/ml.

Le calcul pour cette estimation est le suivant :

$$\frac{|concentration\ 1 - concentration\ 2|}{incertitude\ de\ mesure} = 1,65$$

1,65 est le seuil issue de la table statistique de Gauss pour une probabilité de 95%

Elle peut être communiquée aux cliniciens sur demande. Avant de les proposer aux cliniciens, il faudrait déterminer la méthode de calcul la plus adaptée et la plus sûre. L'utilisation des EEQ et des CIQ externalisés permet de tenir compte à la fois de l'erreur aléatoire et du biais par rapport à la valeur de référence. L'utilisation des EEQ est limitée par le faible nombre d'échantillons. En effet, le contrat passé avec Probioqual assure 12 contrôles par an et par automate. Les calculs présentés ne comportent que 12 valeurs. De plus, bien que l'on puisse tenir compte des niveaux de contrôle, il faut parfois combiner des résultats dont les concentrations sont différentes les unes des autres ce qui peut introduire un biais et surestimer notre incertitude. En comparaison, l'utilisation des biais de justesse à la place des biais d'exactitude induit moins d'erreur car il est basé sur un plus grand nombre de résultats centrés sur une même valeur. De plus avec ces deux méthodes, deux sources de variabilité se surajoutent : celle liée à la fabrication du contrôle et celle liée à sa reconstitution au laboratoire (incertitude des volumes prélevés, homogénéité de la préparation) et un effet matrice peu interférer. L'effet matrice est liée à la nature du milieu de dosage. Les sérums des CIQ et des EEQ sont des matrices transformées notamment car elles contiennent des additifs stabilisants. L'approche utilisant les incertitudes des calibrateurs n'apporte pas ces biais. Elle intègre la variabilité induite par les différentes calibrations. En revanche, elle ne tient pas compte des écarts par rapport à la valeur de référence.

Ses calculs ne rendent pas compte des incertitudes liées à la phase pré-analytique. Les conditions de prélèvement et de stockage ne sont pas incluses. Le calcul le plus juste serait celui du GUM (Guide for Uncertainty Measurement) (21) qui consiste en inclure et cumuler les incertitudes de toutes les étapes (depuis la préparation des étalons, des calibrants, des réactifs, jusqu'à l'incertitude du détecteur de luminescence), Cette approche n'est pas réalisable en pratique.

L'accréditation impose de calculer les incertitudes de mesure pour le processus analytique pour chaque automate. Ceci ne paraît pas pertinent car les dosages peuvent être réalisés aléatoirement sur les deux analyseurs en miroir. L'incertitude combinée apparaît la plus représentative de la performance du laboratoire.

I.4.2. Comparaison des méthodes :

La technique CMIA™ et la technique LOCI™ se distinguent sur plusieurs points. Tout d'abord, la première est en phase hétérogène et la seconde en phase homogène ce qui lui permet de s'affranchir des étapes de lavages. Ensuite, la durée des analyses est plus courte avec la nouvelle méthode sauf pour la progestérone. Il n'y a pas de gain de sensibilité avec la nouvelle méthode. La réduction du volume d'essai requis n'a pas altéré la sensibilité contrairement à ce qui a été décrit pour les techniques par compétition (18). Cependant, le Vista prélève toujours un volume de 200 µl pour constituer son aliquote. Le Vista nécessite un volume supérieur à celui du Centaur qui en tout prélève 150 µL quand il y a un dosage de progestérone associé. Il n'y a pas de gain réel.

La réduction des intervalles de dosages est sans conséquence pour la progestérone et la LH car ces fortes concentrations sont exceptionnelles dans le contexte de la PMA. Par contre, la diminution du domaine de l'estradiol provoquera des dilutions supplémentaires car des concentrations supérieures à 1500pg/ml se rencontrent lors des cycles de FIV. Cette situation n'est pas fréquente. En 2 mois et demi, il y a eu 649 demandes d'estradiol et seules 26 (3,8%) étaient au-dessus de 1500 pg/ml.

Il existe une amélioration de la précision pour l'ensemble des paramètres à l'exception des faibles concentrations d'estradiol.

Les résultats de LH du Vista et du Centaur XP sont concordants. Les biais observés pour l'estradiol et la progestérone sont retrouvés sur les comptes rendus des EEQ probioqual. Cela prouve que les modifications sont liées à la technique et pas aux analyseurs. Estradiol et progestérone ne sont pas transposables mais la relation entre les deux analyseurs est linéaire et il est possible de passer de l'un à l'autre par un facteur de correction.

La méthode LOCI est plus robuste que la méthode CMIA. Elle est moins sensible au changement d'analyseur. Les résultats du Vista sont moins dispersés. Ce progrès existe surtout pour la LH et la progestérone. La dispersion observée sur le diagramme des différences entre le Centaur XP et CP pour la progestérone s'expliquent en partie par les incertitudes de mesures plus grandes avec ces analyseurs.

I.4.3. Impact clinique potentiel

Les informations données par l'échographie des ovaires et de l'endomètre complètent les données de la biologie. Toutes discordances entraînent une demande de contrôle des dosages. Cependant, plusieurs situations sont à considérées.

Quelle que soit l'indication des dosages, une bonne croissance folliculaire (physiologique ou issue de la stimulation exogène par de la FSH) est caractérisée par un doublement de l'estradiolémie toutes les 48 heures. Les incertitudes de mesure sont suffisamment étroites sur toute la gamme de dosage pour ne pas fausser l'interprétation.

La valeur de 50 pg/ml d'estradiol est importante car elle constitue un seuil décisionnel. Lors des cycles de fécondation in vitro, selon le protocole utilisé, un traitement

de blocage de l'axe hypothalamo-hypophysaire peut être mis en place avant de débiter la stimulation. Il faut alors vérifier son efficacité. Une concentration d'estradiol inférieure à 50 pg/ml est le témoin d'un blocage efficace. En accord avec les cliniciens l'incertitude de mesure calculée à ± 10 pg/ml est acceptable.

Le syndrome d'hyperstimulation ovarienne est un des risques associé à la fécondation in vitro. Il s'agit d'une iatrogénie rare mais potentiellement grave. Son incidence n'est pas facile à quantifier. Elle peut varier de 8.4 à 23 % pour les formes bénignes ou de 0.08% à 10% pour les formes sévères. Elle dépend des critères de classification utilisées, des troubles de la fertilité voire de l'utilisation de gonadotrophine ou non (27). Dépister les patientes à risques et prévenir son apparition est difficile. L'estradiolémie est un des paramètres d'orientation. Les valeurs proposées par les études varient entre 2500 et 6000 pg/ml mais sont tributaires des différences inter techniques (27). Il apparaît aussi que des syndromes d'hyperstimulation peuvent se manifester avec des estradiolémies faibles (29 pg/ml et 475 pg/ml) (27). La détermination du seuil décisionnel est délicate. Le service de PMA du CHU de Grenoble utilise une valeur de 4000 pg/ml. De plus, une concentration qui a plus que doublé en 48 heures indique une croissance trop forte. Le CV de fidélité intermédiaire calculé avec le contrôle « 3000pg/ml » fabriqué au laboratoire est de 3.2 %. La technique est satisfaisante. Il faut préciser que la prise de décision est multiparamétrique et inclue aussi l'âge de la patiente, la cause de l'infertilité, le nombre et la taille des ovocytes et le type de cycle de stimulation (FIV ou non).

La diminution des résultats d'estradiol liée au changement de méthode n'influence pas la prise en charge des patientes car elle se répartit sur tous les dosages et la cinétique n'est pas impactée. Certains cycles ont chevauché la période de transition mais un commentaire était inscrit sur le compte rendu pour alerter le service.

La concentration de 1,5 ng/ml de progestérone est importante car elle détermine s'il y a un décalage de la fenêtre d'implantation(28). Au-dessus de cette valeur, il y a un risque d'asynchronisme entre la maturation de l'embryon et de l'endomètre. Dans ce cas, les embryons obtenus sont congelés et implantés lors d'un autre cycle. Le biais de 10% entre les deux méthodes n'a pas d'impact sur la décision médicale.

Les différences observées entre les deux Centaur pour la progestérone auraient pu avoir un impact sur la prise en charge des patientes car une concentration rendue inférieure à 1,5 ng/ml avec le Centaur XP aurait pu être rendu supérieur à 1,5 ng/ml avec le Centaur CP. Notons que l'inverse aurait été possible. Comme on le voit sur la figure 8c, les biais du diagramme de différence s'étendent de +1,5 ng/ml à -2,5 ng/ml. Il n'est pas possible à posteriori de mesurer l'impact potentiel de ces écarts inter-analyseurs.

Les différences observées pour la LH ne sont pas cliniquement significatives. Il n'y avait pas de risque de manquer un pic de LH ou d'en générer un artificiellement.

I.4.4. Respect du contrat et délai de rendu

Les dosages hormonaux réalisés pour le service de PMA font partis des urgences organisationnelles. Le laboratoire s'est engagé à rendre les résultats avant 11 heures à pour les prélèvements qui lui parviennent avant 9 h15. Un travail réalisé en 2012 par Sylvain Millet alors interne de biologie médicale avait contribué à la réorganisation de la prise en charge des bilans de PMA. Il avait comptabilisé 28% de dossiers validés en retard (29). Depuis ce temps, la prise en charge des demandes s'est améliorée. Les prélèvements suivent un parcours particulier afin d'optimiser leur prise en charge. Un système de carte de couleur permet de les identifier efficacement dès leurs arrivées parmi toutes les autres demandes et de les enregistrer plus vite.

La différence essentielle avec le changement d'automate est qu'il y a désormais deux analyseurs disponibles en parallèle, alors que le Centaur CP n'était utilisé qu'en cas de défaillance du Centaur XP. Les analyses durent moins longtemps sauf si un dosage de progestérone est associé ou si une dilution de l'estradiol est nécessaire.

En pratique, aucun impact sur le délai de rendu n'est constaté. Les améliorations de la nouvelle technique sont nivelées par les nombreux dosages réalisés en même temps par le Vista. De plus, les analyses de fertilité sont faites pendant le pic d'activité du laboratoire.

Les retards ne sont pas nombreux au regard du nombre de bilan traités. Comparé à l'année 2014 leur fréquence a diminué et leur amplitude est plus faible. Les causes dites « pré-analytiques » regroupent dans ce travail que la réception et l'enregistrement. Les délais à l'enregistrement peuvent s'expliquer par un manque d'attention, un manque d'effectif ou une surcharge de travail. Les causes dites « analytiques » regroupent 4 phases : panne de la chaîne de convoyage, panne des centrifugeuses, panne d'automate et retard à la vérification technique des résultats. Il n'est pas possible d'en discriminer l'origine au cours de la période étudiée. Certains sont probablement dus à des pannes d'analyseur car tous les dossiers de PMA sont rendus en retard alors qu'ils ont été réceptionnés avant 9 heures 15. Ces pannes n'ont pas été tracées. Dans la phase dite « post analytique », il y a la validation biologique. Celle-ci est soumise à de nombreux aléas. La charge de travail est très variable et dépend des problèmes du jour (nombre d'appels téléphoniques des services cliniques, pannes d'analyseurs à gérer, non-conformité pré-analytique, etc.). En pratique, il serait envisageable de faire un point sur le nombre de bilan de PMA du jour en faisant une extraction informatique vers 10 heures 30. Le résultat de cette extraction nous renseigne sur le nombre de bilans validés ou en cours. Lorsque 11 heures approche, il est possible de ne valider que les bilans de PMA en filtrant les dossiers par service.

La réduction des retards est probablement liée à une amélioration de la prise en charge des bilans de PMA. Un travail de communication a été engagé notamment avec la rédaction d'un document d'aide à la validation des hormones de fertilité. Le travail réalisé sur les hormones de fertilité sur la même période a pu attirer l'attention sur les résultats. Un biais d'échantillonnage est aussi possible. Une étude des délais de rendu faite sur la totalité de l'année 2014 (résultats non communiqués) indique qu'il existe des périodes avec plus de retards que d'autres. Nous pouvons être dans une bonne période. Il sera donc nécessaire de renouveler cette évaluation.

Les retards ne sont pas tracés. Lorsque les résultats ne sont pas rendus dans les délais, il n'est pas possible d'identifier les causes ni de savoir si le service de PMA a été prévenu. Le document d'aide à la validation comporte une partie indiquant la marche à suivre en cas de retard probable : appeler le secrétariat du service et tracer l'appel dans une fiche informatique. Deux outils informatiques pourraient être utilisés pour améliorer la traçabilité : le système informatique du laboratoire (Synergy) en créant une non-conformité interne, ou un logiciel dédié à la qualité (Qualnet) en créant une fiche dite « d'évènement indésirable ». Le tableau 14 synthétise les avantages et inconvénients de chaque solution.

	Non-conformité dans synergie	Fiche QualNet
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> -Logiciel déjà ouvert au cours de validation : -réalisation de la non-conformité directement dans le SIL - minimise le risque d'oubli, -moins contraignant. 	<ul style="list-style-type: none"> -Une déclaration suffit pour le jour concerné -Permet de préciser la cause du retard et le nombre de bilan concernés -Permet de tracer que le service est prévenu.
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> -Créer une non-conformité spécifique aux bilans de PMA qui ne soit pas imprimable sur les comptes rendus -Ne permet pas de préciser la cause -Sur quel dossier faire la déclaration ? Faire une déclaration sur chaque dossier en retard est trop lourd 	<ul style="list-style-type: none"> -Risque d'oubli -Contraignant car beaucoup de champs obligatoires

Tableau 14 : Avantages et inconvénients de chaque solution de traçabilité des retards.

Les fiches de dysfonctionnement dans Qualnet ont été conçues pour déclarer les non conformités internes au laboratoire alors que Synergy est d'avantage orienté vers les non-conformités externes, liées à la réception des échantillons. Le logiciel Qualnet semble plus adapté au besoin. Identifier la cause est indispensable si l'on veut mettre en place des actions correctives.

I.4.5. Bilan du changement d'automate :

Ce changement a entraîné une amélioration dans l'organisation du travail. Il a permis le retrait de l'automate Centaur CP qui ne servait qu'aux analyses des hormones de fertilité en cas de défaillance du Centaur XP. Ce retrait permet de s'affranchir des maintenances quotidiennes. Les passages des CIQ et les calibrations sont maintenant gérés automatiquement par les Vista ce qui n'était pas le cas avec les analyseurs Centaur (XP et CP). De plus les deux analyseurs sont sur la chaîne et le flux des tubes est optimisé par un logiciel informatique. La panne de l'un est compensée automatiquement par l'autre.

La nouvelle méthode est plus précise la concordance entre les résultats des deux Vista est meilleure.

Ce transfert a été l'occasion de changer la présentation du compte rendu et de rendre les résultats en pg/ml (unité utilisée couramment par le service de PMA) alors qu'ils étaient jusque-là rendus en pmol/L (unité du système international), ce qui imposait au service de faire la conversion systématiquement.

En revanche, cette réorganisation n'a rien modifié dans les dépenses liées aux hormones de fertilité. En effet, les analyses sont facturées au coût patient (LH : 1,35 € ; Progestérone : 1,86€ ; Estradiol : 1,60€ hors taxe) qui prend en compte, entre autre, le coût des réactifs, des calibrants et des analyseurs. L'effectif du personnel n'a pas évolué.

II) Comparaison des concentrations sériques et urinaires de la LH et de l'estradiol chez les femmes suivies dans le service de procréation médicalement assistée

II.1 Introduction :

A ces débuts, l'assistance médicale pour la procréation a utilisé l'urine pour le suivi des patientes. L'hormone dosée était la LH et les prélèvements étaient fréquents (parfois toutes les 3 heures). (30)

Progressivement, avec l'amélioration des techniques, les dosages sériques sont devenus majoritaires.

Le parcours des patientes au cours des cycles de traitement est souvent lourd et fatigant. Les prélèvements sanguins réguliers et contribuent à cette pénibilité. Dans l'optique d'améliorer le confort des patientes, les cliniciens nous ont demandé d'évaluer si les dosages urinaires ou salivaires étaient envisageables.

Les prélèvements d'urines sont moins invasifs et potentiellement moins contraignants que les prélèvements sanguins. C'est un milieu de dosage déjà validé pour l'analyse de certaines hormones comme le cortisol. De nombreux dispositifs (à l'instar du Clearblue (31)) dosent la LH et l'estrone glucuronide dans les urines pour évaluer la période de fertilité et optimiser les chances de concevoir. Ces tests sont optimisés pour cette matrice alors que la technique LOCI® que nous avons mis en place pour les analyses sériques au laboratoire n'est pas validée pour les dosages urinaires. Les effets matrices ne sont pas connus.

Les analyses bibliographiques montrent que la concentration d'estradiol libre éliminée dans les urines est faible (de l'ordre de 4 µg/g de créatinine voire de 4 µg par jour)(32)(33)(34) et qu'elle n'est pas la molécule de référence pour les analyses urinaires(12).

L'objectif de ce travail est d'évaluer, dans un premier temps, la fiabilité du dosage urinaire de LH et d'estradiol avec la méthode LOCI® puis de voir si les concentrations urinaires reflètent suffisamment les concentrations sériques pour être applicables à la pratique clinique.

II.2 Matériel et méthode

II.2.1. Analyseur

L'analyseur utilisé est le Dimension Vista 1500 de Siemens. Deux appareils en miroir sont disponibles. Ils sont décrits dans la première partie. Les dosages sont réalisés par immunochimiluminescence. Les caractéristiques de fiabilité dans les urines ne sont pas connues et sont à déterminer.

II.2.2. Etude préliminaire

Afin de tester la faisabilité du dosage, les premiers tests sont effectués sur des urines de femmes enceintes. Les échantillons proviennent de patientes suivies au laboratoire. Des concentrations supérieures à 1500 pg/ml d'estradiol sont diluées au 1/5^{ème}, 1/10^{ème} et 1/20^{ème} pour tester la linéarité de la méthode. Dans un deuxième temps, les analyses sont faites sur des urines de femmes non enceintes pour tester la sensibilité et la variabilité de la méthode.

Pour étudier la précision du dosage de l'estradiol, trois contrôles internes de concentration respective de 15 pg/ml, 250 pg/ml et 1050 pg/ml sont fabriqués au laboratoire en mélangeant plusieurs urines de patientes. Chaque pool est divisé en 15 aliquotes de 50 µl. Le tout est congelé à -20°C. Une aliquote est analysé quotidiennement sur chaque analyseur pendant 15 jours. Les résultats sont comparés aux résultats de fidélité intermédiaire obtenu pour les dosages sériques.

La fiabilité des dosages de LH est testée à l'aide des urines de 4 patientes non enceintes.

II.2.3. Etude de la stabilité dans l'urine :

La stabilité de l'estradiol et de la LH dans les urines a été testée sur 24 heures, à 4°C et entre 18 et 25°C à l'abri de la lumière. Les prélèvements utilisés pour les tests de stabilité sont issus de l'activité quotidienne du laboratoire. Certains correspondent à des urines de femmes enceintes. Ils ont été aliquotés en deux exemplaires. Le premier a été conservé au réfrigérateur, le second a été conservé sur la paillasse. Une variation est considérée comme significative si la différence entre les deux valeurs est supérieure à 2,8 x le CV de reproductibilité obtenu en utilisant les mélanges d'urine fait au laboratoire pour l'estradiol et avec les CIQ sériques de Biorad pour la LH. Dans les deux cas, les résultats des deux automates sont regroupés.

II.2.4. Protocole d'essai

Le projet est expliqué lors d'un entretien individuel entre la patiente et une sage-femme. Il n'y a pas de critères d'exclusion. Toutes les patientes sont informées du but du travail. Il est clairement indiqué qu'elles peuvent quitter l'étude en toute liberté. Une lettre d'information leur a été remise, un exemplaire est présenté dans l'annexe 3. Le Comité Consultatif pour la Protection des Personnes pour la Recherche Biomédicale (CPPRB) a estimé qu'il n'était pas nécessaire de soumettre ce projet à son approbation.

Les dosages sont réalisés sur les urines recueillies le matin le jour de la consultation en PMA. Un prélèvement sanguin est réalisé en parallèle puis urine et sang sont envoyés au laboratoire. Ils sont centrifugés 10 minutes à 3000 tours/min avant d'être analysés. Le choix de l'appareil est aléatoire.

Les résultats urinaires sont analysés avec et sans normalisation par la créatinine urinaire.

Les données complémentaires (jour du cycle, nombre d'ovocytes, date d'ovulation) sont issues de l'exploitation du logiciel Medifirst®. Seuls les follicules de dimension supérieure à 14 mm sont retenus.

Une concentration de LH sérique supérieure à 10 mUI/ml est utilisé comme seuil de début de pic ovulatoire (35).

Traitement des données :

Les résultats sont traités à l'aide du logiciel Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), et exprimés par la moyenne et écart type pour les analyse de fiabilité et par la moyenne et l'étendue (minimum-maximum) pour l'étude des dosages urinaire chez les patientes en PMA, l'objectif étant de représenter au mieux la diversité des concentrations rencontrées en pratique clinique. L'évolution des concentrations est analysée en fonction du délai séparant le jour de prélèvement de la date de l'ovulation. Celle-ci n'est pas toujours connue avec précision. La date de ponction fait office de jour d'ovulation pour les patientes suivies en cycle de fécondation in vitro. Dans les autres cycles, la date de l'insémination artificielle ou deux jours après la plus forte valeur de LH sérique est utilisé comme jour de référence. Les prélèvements compris entre J-3 et J0 sont utilisés pour rechercher les pics de LH pour les cycles de SO, IU et TE.

Pour être acceptable, les résultats urinaires doivent être corrélés avec les concentrations sériques et présenter une évolution comparable au sérum sur deux prélèvements successifs. Il faut pouvoir définir une valeur seuil pour déclencher ou prédire une ovulation imminente. En cas de FIV, cette valeur seuil sera un rapport entre l'estradiolurie et le nombre d'ovocytes deux jours avant la ponction. Dans le autres cas, il faudra définir une concentration de LH urinaire qui dépiste le début du pic ovulatoire. LH et estradiol doivent être stable dans les urines.

Les données sont traitées à l'aide du logiciel Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Pour les analyses statistiques, la normalité des distributions est évaluée à l'aide du test de Kolmogorov-Smirnov. En cas de distribution normale, les tests paramétriques utilisés sont l'ANOVA pour les variances et le test de t de Student pour les moyennes. Lorsque la distribution n'est pas Normale, les moyennes sont comparées par un test de Mann et Whitney. Les calculs statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel en ligne biostaTGV. Les résultats des tests de fiabilité sont traités par L'algorithme A (cf. partie I). (23)

II.3 Résultats

II.3.1. Fiabilité des dosages urinaires

Les résultats des urines de femmes enceintes sont compris entre 1808 et 1850 pg/ml. Les dilutions montrent que la linéarité est bonne. Les coefficients de détermination sont de 1. Il n'y a pas d'effet matrice significatif.

Le tableau 15 compare les résultats de fidélité intermédiaire des urines aux valeurs obtenues avec le sérum. Les résultats des deux analyseurs sont combinés. Les différences mises en évidence dans la première partie entre le Vista 1 et le Vista 3 sont les mêmes avec les urines. Les résultats urinaires sont fiables. La méthode LOCI peut être utilisée pour le dosage de l'estradiol dans les urines.

	Urine			sérum		
	moyenne	CV	n	moyenne	CV	n
niveau 1 (pg/ml)	16,05	14,9	26	22,5	21,5	345
niveau 2 (pg/ml)	234	4,9	26	323,8	2,85	335
niveau 3 (pg/ml)	1030	3,05	26	754,0	2,90	338

Tableau 15 : Résultats de fidélité intermédiaire pour l'estradiolurie.

Les résultats de LH urinaire évalués sur les femmes non enceintes sont équivalents sur les deux Vista. Les concentrations mesurées s'étendent de 5 à 9.7 mUI/ml. La méthode est fiable pour la LH urinaire.

II.3.2 Test de stabilité de l'estradiol et de la LH dans les urines :

Conservation à 4°C : Parmi les 16 urines testées pour l'estradiol, 15 ont évolué de manière significative. Il s'agit d'une augmentation pour 12 d'entre elles et l'importance varie d'une patiente à une autre. L'augmentation moyenne est de 107 pg/ml (augmentation maximale de 958,8 pg/ml). Deux concentrations ont baissé (- 66 et -183,8 pg/ml). Quatorze urines sont analysées pour la LH. Aucune différence significative n'est observée pour les concentrations de LH (variation de 8%).

Conservation entre 18 et 25 °C : Deux concentrations d'estradiol sont restées stables, une a chuté (-81,7 pg/ml), les autres ont augmenté. L'augmentation moyenne est de 319 pg/ml (augmentation maximale de 814,8 pg/ml). Aucune différence significative n'est observée pour la LH (variation de 5%).

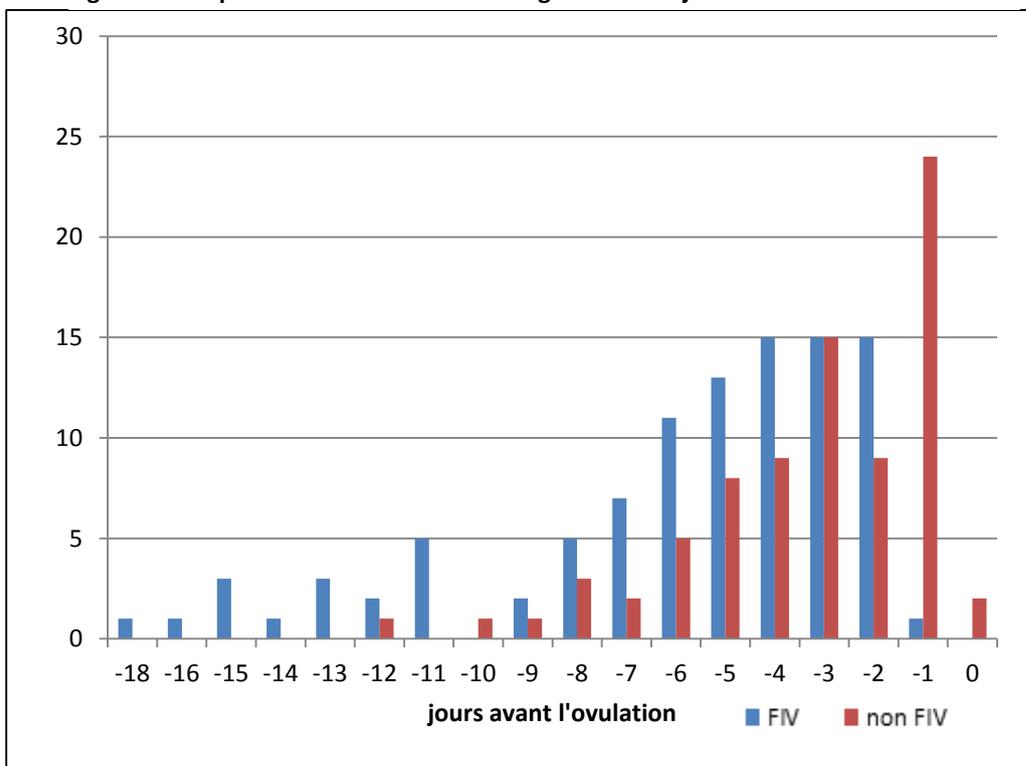
II.3.3 Comparaison des résultats sériques et urinaires

II.3.3.1. Description de l'échantillon :

L'étude est menée sur une période de deux mois et demi (du 2 avril au 12 juin 2015). Cent patientes ont acceptés de participer à cette étude (soit 50 % des patientes suivies au cours de cette période) et nous avons reçu 207 prélèvements urinaires. Cent douze (54%) ont été fait dans un contexte de fécondation in vitro, 50 (24,1%) dans un cadre de suivi d'ovulation, 37 (17%) correspondent à des inséminations intra-utérine et 8(3,9%) correspondent à des cycles pour transfert d'embryons congelés. En médiane, nous avons deux prélèvements par femme. Le nombre total de cycles suivis est de 109. Vingt-sept sont associés à un minimum de 3 analyses urinaires par cycle.

La figure 11 montre que les prélèvements obtenus couvrent l'ensemble des phases (vérification du blocage de l'axe, croissance folliculaire et dépistage du pic de LH). Les jours correspondant à la vérification du blocage de l'axe (entre J-18 et J-10) ne représente que 5 % de l'ensemble des prélèvements. Soixante et un pourcent des analyses ont été faites au cours de la croissance folliculaire. Vingt-quatre pourcent des prélèvements sont compris entre J-3 et J0.

Figure 12 : Répartition du nombre de dosages selon les jours avant l'ovulation.

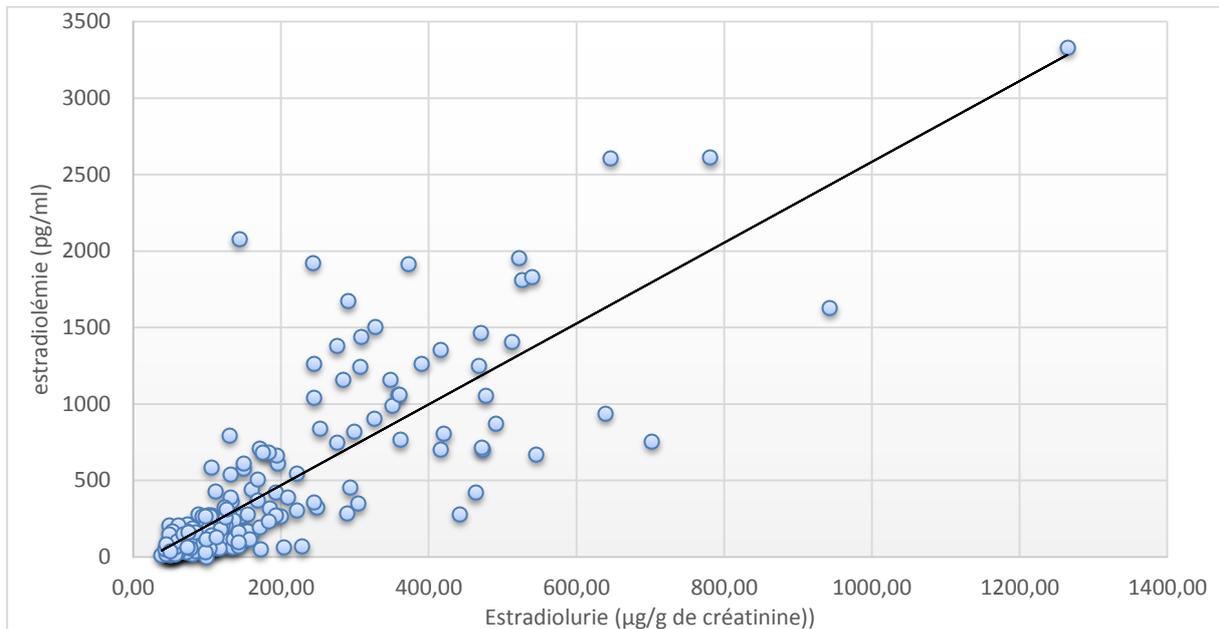


II.3.3.2. Etude des résultats d'estradiol :

Corrélations sérum/Urine

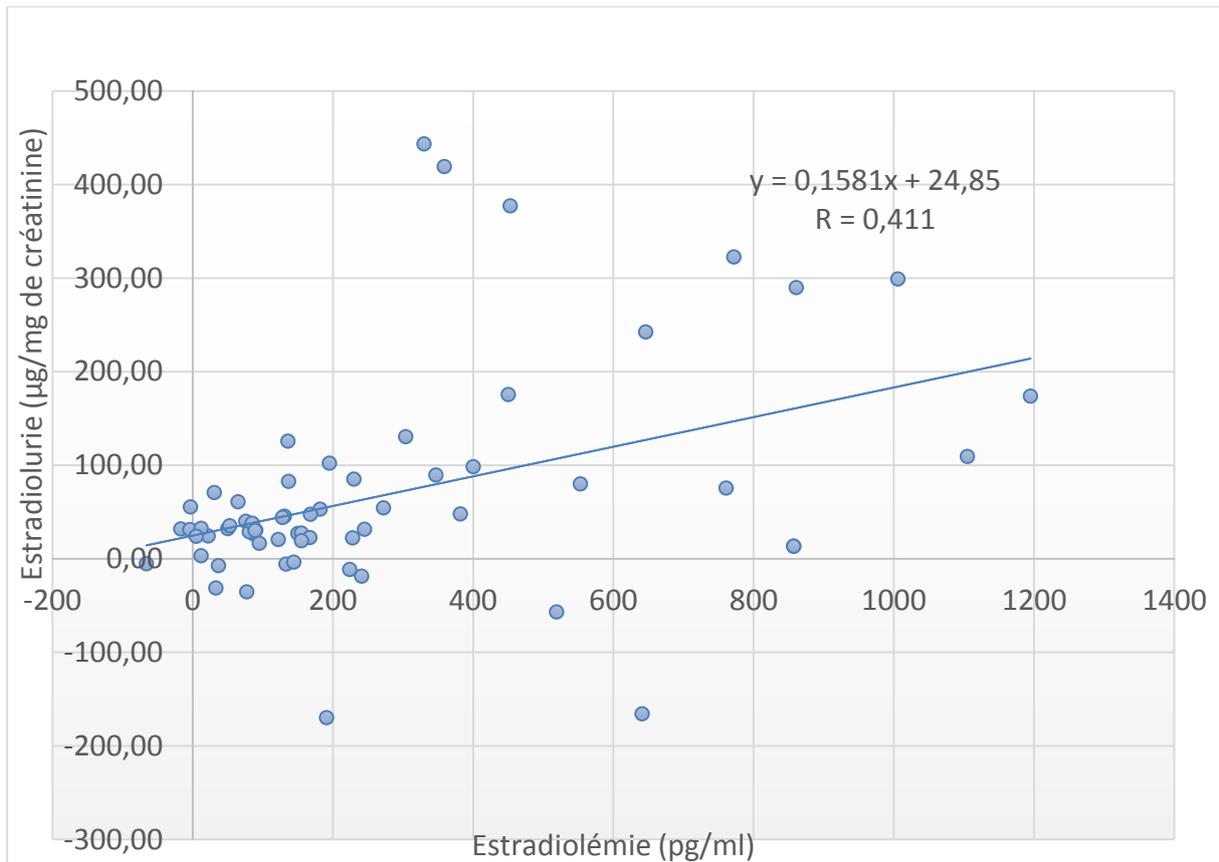
Les concentrations mesurées dans les urines sans correction par la créatinine vont de 14 à 1439 µg/g. Avec correction, elles s'étendent de 38 à 1264 µg/g de créatinine. La figure 13 présente le résultat de l'étude de corrélation. Elle montre une grande dispersion des résultats. Celle-ci est plus importante pour les fortes concentrations sériques. La droite de régression a pour équation $y = 2,64x - 60,28$. Le coefficient de régression R est de 0,817. La correction par la créatininurie a diminuée la dispersion (R = 0.676 sans correction).

Figure 13 : Etude de la corrélation entre les résultats de l'estradiolémie et de l'estradiolurie corrigée. (N=207)



Au cours des stimulations, la posologie de FSH dépend de la croissance folliculaire qui s'apprécie, entre autre, par l'évolution des concentrations sériques entre deux prélèvements. L'évolution des concentrations sériques et urinaires entre deux dosages successifs est variable. La figure 14 montre qu'il n'y a pas de concordance entre le sérum et l'urine. Quand la concentration sérique augmente, la concentration urinaire n'augmente pas dans les mêmes proportions et peut diminuer. Il peut y avoir entre 2 et 8 jours entre deux dosages.

Figure 14 : Evolution comparée des différences entre estradiolémie et estradiolurie sur deux dosages consécutifs.



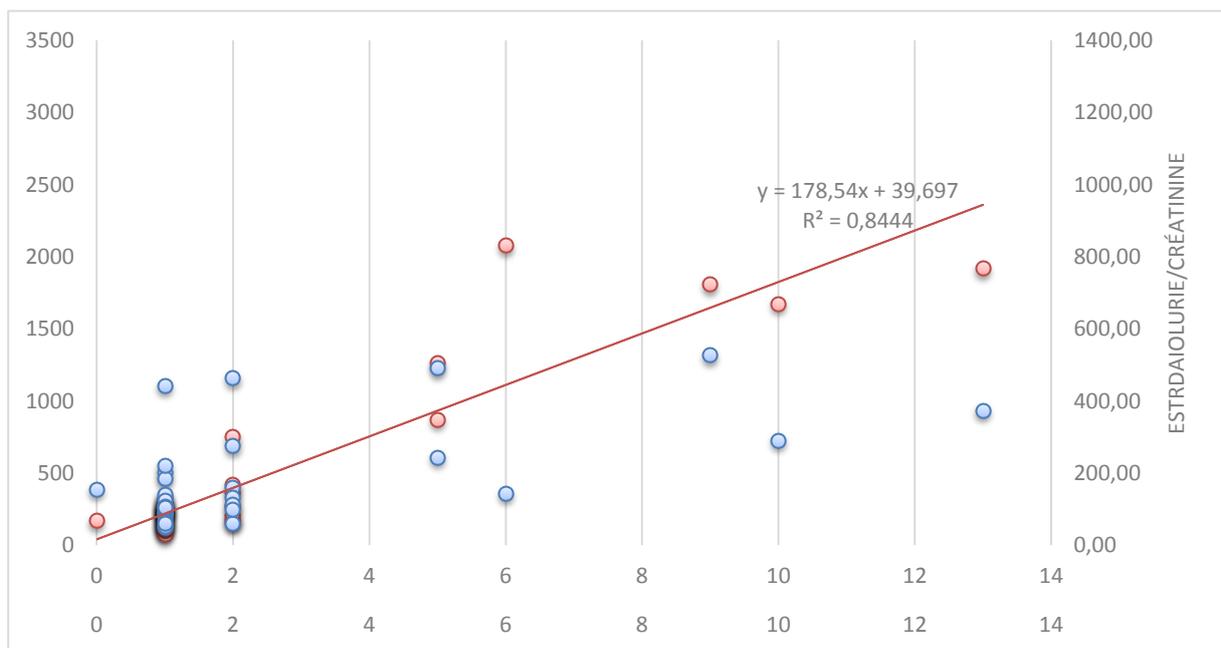
L'estradiolurie et blocage de l'axe:

L'objectif est de voir s'il existe une valeur seuil urinaire en-dessous de laquelle on peut considérer que le blocage de l'axe est efficace. Le seuil sérique est de 50 pg/ml. Si on considère les prélèvements sériques pour lesquels la concentration est inférieure à 50 pg/ml (18 échantillons), les concentrations urinaires varient entre 38.1 et 96 µg/g de créatinine. En posant 96 µg/g comme valeur seuil, 23 % des concentrations sériques sont inférieures à 50 pg/ml. Les autres concentrations se répartissent entre 12 et 276 pg/ml. On ne peut pas fixer de seuil urinaire.

L'estradiolurie et nombre d'ovocytes :

L'étude de la relation entre le nombre d'ovocyte et l'estradiolémie ou l'estradiolurie/créatinine est présentée sur la figure 15. Le coefficient de régression pour l'estradiolémie est de 0,918 alors que celui de l'estradiolurie corrigée de la créatinine est de 0,589. Il n'existe pas de corrélation entre l'estradiolurie et le nombre d'ovocytes.

Figure 15 : relation entre le nombre d'ovocyte et l'estradiolémie (en rouge) et entre le nombre d'ovocyte et l'estradiolurie (en bleu)

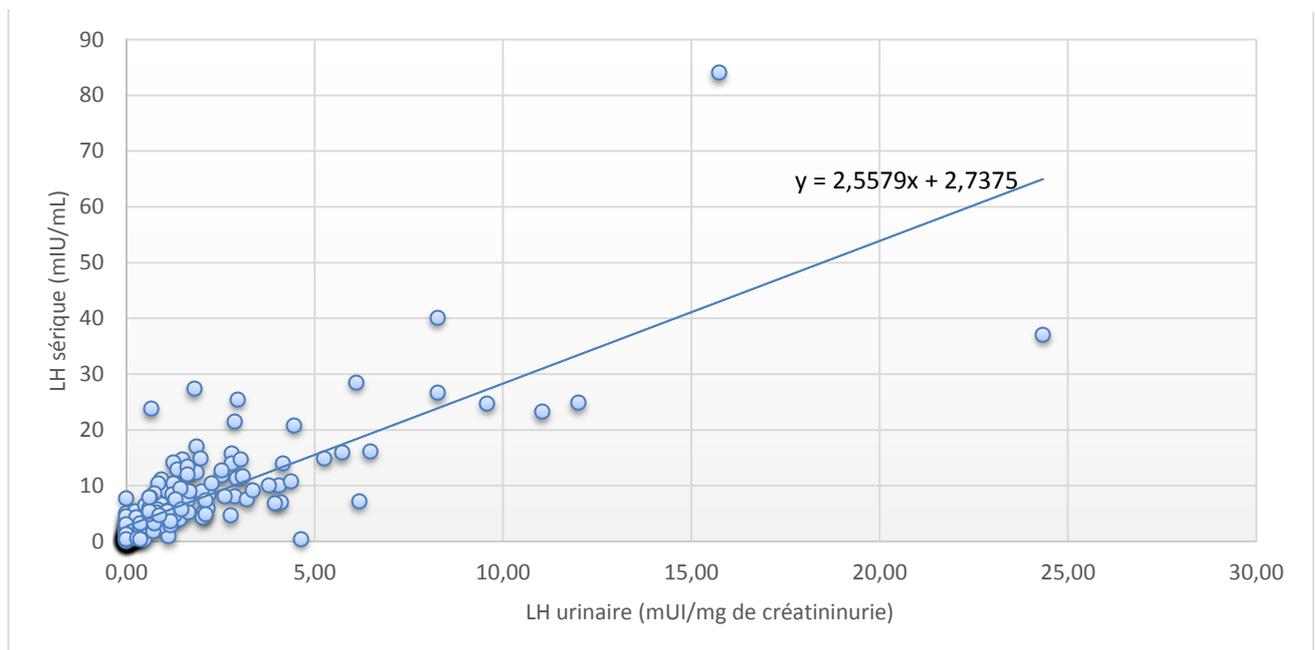


II.3.3.3. études des résultats de LH

Corrélation LH sérique/LH urinaire et dépistage d'un pic sérique

Les concentrations urinaires sans normalisations vont de < 0.2 mUI/ml à 24.5 mUI/ml. La concentration sérique est, en moyenne, 2,5 fois plus élevée que la concentration urinaire. Il existe une grande dispersion des données (R=0,79). La corrélation entre sérum et urine est présentée sur la figure 16. Tous les dosages inférieurs à la limite de quantification de notre analyseur sont exclus soit 58% des prélèvements de cycle de FIV et 2,1% des autres cycles. La correction par la créatininurie a réduit la dispersion (R = 0,706 sans correction).

Figure 16 : Etude de la corrélation entre concentration sérique et concentration urinaire de la LH. (N=140)



Tant que la concentration sérique est inférieure à 4 mUI/ml, la LH est indétectable dans les urines.

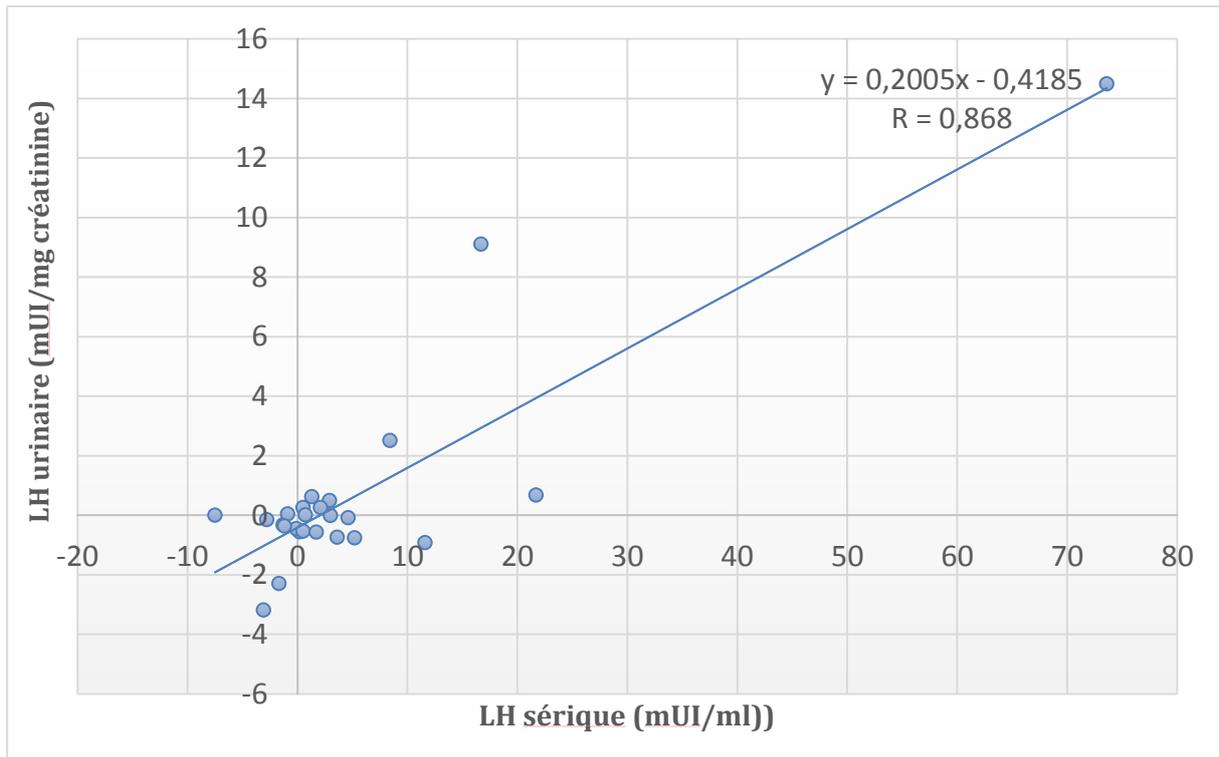
En considérant les prélèvements donnant un résultat sérique inférieur au seuil de 10 mUI/ml, toutes les concentrations urinaires sont comprises entre 0,2 et 8,26 mUI/mg de créatinine. Trente-neuf prélèvements sériques ont une concentration supérieure à 10 mUI/ml. Avec un seuil urinaire à 8,26 mUI/mg de créatinine, on ne dépiste que 7 patientes (18%). Compte tenu de la dispersion des points sur le graphique de corrélation, on pourrait suggérer un seuil de 5 mUI/mg de créatinine. Il y aurait 1 faux positif, on dépisterait 11 pics sur 39 (28%) et il y aurait 28 faux négatifs. Une valeur seuil urinaire plus basse augmenterait le nombre de faux positifs sans améliorer le dépistage des pics.

Ces résultats ne sont pas satisfaisants. Il n'apparaît pas possible de définir une valeur seuil avec ces conditions de prélèvement urinaire.

Evolution des concentrations sur deux prélèvements consécutifs

Les différences entre deux dosages consécutifs sont présentées sur la figure 17. Ce graphique représente 25 prélèvements. Il n'a pas été possible d'en sélectionner plus à cause des concentrations inférieures à la limite de détection. L'amplitude des différences sériques n'est toujours visible avec les mesures urinaires. Il peut y avoir une diminution de l'estradiolurie alors que l'estradiolémie augmente. Il peut y avoir entre 2 et 8 jours entre deux dosages.

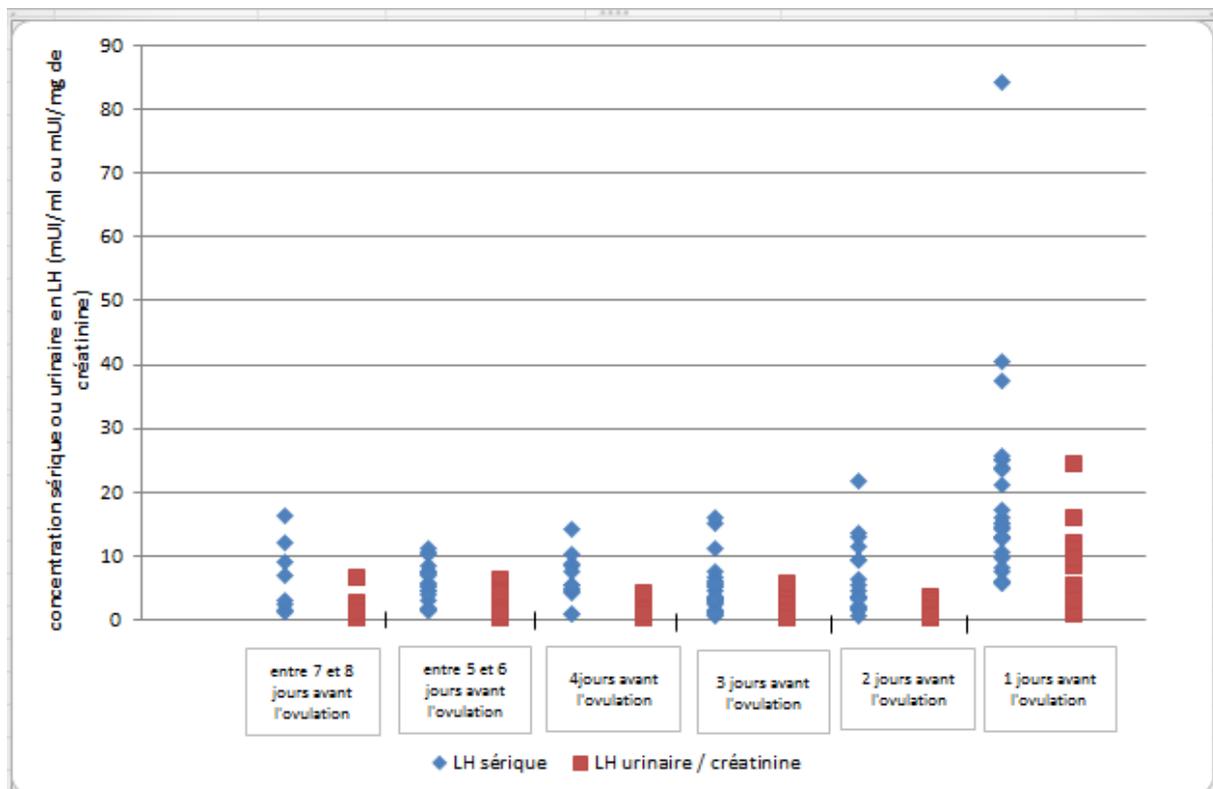
Figure 17 : Evolution comparée des concentrations sériques et urinaires en LH pour 25 couples d'échantillons sur 2 dosages consécutifs



La figure 18 représente comment évoluent les concentrations urinaires et sériques en fonction du jour avant l'ovulation. Il exclue les prélèvements dont la concentration urinaire est en-dessous de la limite de détection. Il est construit avec 93 prélèvements des patientes pour lesquelles la LH urinaire est supérieure à la limite de quantification de notre méthode. Les résultats des concentrations de LH sériques ou urinaires ne diffèrent pas significativement lorsque les prélèvements sont fait entre 8 jours et 2 jours avant l'ovulation. Ils deviennent significativement différents 1 jour avant l'ovulation ($p < 0.001$ pour le sérum ; $p=0.011$ pour les urines).

Les augmentations précoces de LH ne sont pas mises en évidence par les prélèvements urinaires.

Figure 18 : Evolution comparée des concentrations sériques et urinaires pour la LH en fonction des jours avant l'ovulation (les cycles de fécondation in vitro sont exclus). Chaque bande correspond à l'étendue des concentrations mesurées sur la période considérée.



II.4. Discussion :

L'objectif de ce travail était d'évaluer si les dosages urinaires étaient utilisables pour le suivi des cycles de PMA.

II.4.1. Fiabilité des dosages urinaires

La problématique initiale de l'étude était de savoir si les méthodes LOCI™ pouvaient doser l'estradiol dans les urines. En effet, les articles qui traitent des dosages des estrogènes urinaires parlent principalement des dérivés glucuroconjugués et non de l'estradiol. La molécule la plus adaptée à ce type d'analyse est l'estrone-glucuronide en raison de sa forte concentration et de sa bonne adéquation avec les concentrations sérique (1) (2) (36). Les anticorps utilisés ne sont pas sensibles aux métabolites de l'estradiol (20). De plus, la concentration urinaire en estradiol libre semble faible (32) (33) (34). Les premiers dosages réalisés sur les urines de femmes enceintes et non enceintes ont été concluants nous ont prouvé que c'était faisable.

Les concentrations obtenues chez les femmes non enceintes sont du même ordre de grandeur que celles rencontrées dans le sérum. Les propriétés physico chimiques des urines n'interfèrent pas avec les dosages. Le problème est que nous n'avons pas d'urines contrôlées dont la concentration est connue. La justesse et la spécificité de nos analyses n'ont pas pu être vérifiées.

Les CV de fidélité intermédiaire obtenus avec les urines sont comparables à ceux obtenus avec du sérum.

Par contre, l'estradiolurie n'est pas stable et la variation n'est pas prévisible. Il s'agit le plus souvent d'une augmentation des concentrations et la température de stockage influe sur la cinétique. L'activité glucuronidase présente dans les urines (37) peut expliquer cette évolution. Cette enzyme hydrolyse l'estradiol glucuroconjugué et enrichit progressivement l'urine en estradiol. Les diminutions observées pourraient s'expliquer par une oxydation de l'estradiol en estrone. Les résultats rendus sont tributaires du délai d'acheminement des pots à urines et des conditions de transport. Ces derniers varient d'une patiente à une autre, fluctuent avec les saisons et ne sont pas maîtrisables en pratique à moins de demander aux patientes de réaliser leur prélèvement urinaire dans le service clinique.

Face aux problèmes de l'hydrolyse, deux solutions seraient envisageables :

- Hydrolyser tous les conjugués pour faire un dosage de l'estradiol total urinaire. Deux approches sont envisageables : la méthode enzymatique ou la méthode chimique
- Utiliser un inhibiteur enzymatique (par exemple de l'acide glucuronique).

Aucune de ces deux solutions ne peut être mise en place au quotidien, essentiellement pour des raisons organisationnelles et pratiques. Le protocole d'hydrolyse chimique le plus court nécessiterait 15 min à 100°C à l'aide dans une solution d'acide chloridrique entre 15 et 150 mM. Il faudrait ensuite ramener l'urine à un pH compatible avec les tests immunométriques. L'hydrolyse enzymatique la plus courte à l'aide d'une *bêta-glucuronidase* recombinante prendrait 30 minutes à 37°C (38). Or en tenant compte de différentes étapes supplémentaires (enregistrement, centrifugation de 10 minutes et l'analyse) il serait difficile de tenir notre engagement à rendre les résultats pour 11 heures. D'autre part, il faudrait libérer du temps technique et tous ces étapes font perdre le bénéfice de l'automatisation. Utiliser un inhibiteur serait plus simple sur le plan technique car il n'y aurait aucune technique additionnelle. Cependant il devrait être directement présent dans le pot de recueil des urines et il n'existe pas de dispositifs prêts à l'emploi ce qui contraindrait à les préparer à l'avance.

De plus, le risque que le contenu soit jeté accidentellement par les patientes existe et n'est pas maîtrisable.

La précision des résultats d'estradiol observée avec les tests de fidélité intermédiaire ne font pas ressortir ce problème de stabilité car les urines ont été congelées. Cela a probablement bloqué l'hydrolyse ou l'oxydation.

Les tests de dosages de LH ont été moins poussés car la LH est dosée par de nombreuses études dans les urines (36)(39). Nos résultats sur les urines de femmes non enceintes ont été concluants. La LH est stable à 4°C et à température ambiante, Les résultats rendus sont fiables et interprétable.

Nous ne pouvons pas valider la méthode essentiellement pour des raisons de mauvaise conservation de l'estradiol.

Un des points faibles de notre étude est que nous n'avons pas étudié la stabilité 4 heures après le dosage. Cela aurait été plus représentatif du temps écoulé entre le prélèvement et l'analyse au laboratoire. Le choix des 24 heures a été fait pour évaluer s'il était possible de faire un dosage sur des prélèvements oubliés par les patientes et ramené le lendemain.

Il aurait fallu faire un volume plus important de mélange d'urine pour obtenir un nombre de contrôle interne plus important. Treize passages par automate n'est pas suffisant pour avoir une représentation significative des performances des dosages urinaires.

Il aurait été préférable de faire des tests de fidélité intermédiaire sur la LH et non d'utiliser les résultats sériques pour l'analyse de la stabilité. Ce choix a été fait car les résultats pour l'estradiol étaient comparables entre sérum et urines et pour ne pas utiliser trop de réactif.

II.4.2. Application aux cycles de PMA

Dosages de l'estradiol

Les concentrations sériques et urinaires ne sont pas corrélées. La correction par la créatine n'améliore pas les résultats.

Lors du suivi des patientes (avec ou sans stimulation), une concentration sérique en estradiol qui double tous les deux jours reflète une bonne cinétique de croissance et de maturation folliculaire. Il n'est pas possible de trouver une équivalence avec les résultats urinaires. Il n'est pas possible d'évaluer la maturation folliculaire.

Au cours de cycles de fécondations in vitro, il est parfois requis de réaliser un blocage de l'axe gonadotrope avant de débiter la stimulation. Le marqueur essentiel du blocage est une concentration en estradiol inférieure à 50 pg/ml. Cependant, il existe une trop grande dispersion des résultats urinaires quand on analyse les prélèvements dont la concentration sérique est inférieure à 50 pg/ml. Les résultats urinaires ne permettent pas d'établir une valeur seuil comparable. Il n'apparaît pas possible d'affirmer un bon blocage de l'axe gonadotrope sur la base de l'estradiolurie.

Lors du premier contrôle de la stimulation, l'intervalle des concentrations sériques cible est compris entre 200 et 400 pg/ml. Lorsque les résultats des patientes sont en dehors de cet intervalle, les doses de FSH sont soit augmentées soit diminuées. Les résultats montrent que les concentrations urinaires sont trop variables pour pouvoir définir un intervalle d'acceptation. Il n'est pas possible d'adapter une posologie sur la base des données urinaires.

L'objectif des FIV étant d'obtenir un maximum d'ovocytes pour augmenter les chances d'avoir un embryon viable, les concentrations sériques en estradiol sont souvent élevées et atteignent parfois des valeurs supra-physiologiques. Le risque principal est la survenue d'un syndrome d'hyperstimulation ovarienne. La figure 13, montre qu'une forte augmentation sérique peut ne pas être mise en évidence dans les urines. De plus, lors que les concentrations sériques sont supérieures à 2000 pg/ml, les concentrations urinaires peuvent varier entre 146 et 1264 µg/g de créatinine. Le risque de ne pas dépister un syndrome d'hyperstimulation est très grand.

La concentration urinaire de l'estradiol dépend de plusieurs mécanismes : le métabolisme hépatique, la filtration glomérulaire, la sécrétion tubulaire et l'hydrolyse in situ de l'estradiol glucuroconjugué. Cette diversité explique en partie l'absence de corrélation entre le sérum et les urines. En revanche, il existe une bonne adéquation entre les concentrations sériques en estradiol et les concentrations urinaires en estrogènes totaux (40). La forte spécificité de l'anticorps utilisé dessert le dosage urinaire.

Dosage de la LH

La LH urinaire ne présente pas non plus une bonne corrélation avec les valeurs sériques. Ces résultats sont surprenants compte tenu des nombreux travaux réalisés avec ce paramètre urinaire.

Le dosage de la LH devrait permettre de dépister une élévation de la concentration signant le début du pic ovulatoire. La définition d'une valeur seuil pour identifier un pic varie d'une étude à l'autre. D'après l'étude de Judith Ross et col (41) l'intervalle des concentrations sériques avant le pic varie entre 3,6 et 9,9 mUI/ml et entre 8,5 et 74 mUI/ml au moment du pic. Selon le contexte, le service de PMA de Grenoble utilise deux approches. Une forme dynamique (doublement de concentration par rapport à la valeur basale) ou dépassement d'une valeur seuil (fixée à 10 mUI/ml). Les résultats que nous obtenons montrent qu'il n'est pas possible d'établir un seuil à partir des concentrations urinaires. Susanna J. Park et col (35) ont analysée l'évolution de la concentration urinaire sur 43 cycle et ont trouvés des valeurs de base de 6.69 ± 5.22 mUI/mg créatinine. Les concentrations trouvées au moment du pic étaient de $41,2 \pm 20$ mUI/mg de créatinine. En comparaison, les résultats de notre étude sont plus bas. Les prélèvements sont peut-être trop précoces et nous manquons le pic ovulatoire. Cette différence peut aussi être liée à la technique utilisée (immunofluorescence vs immunochimiluminescence). La figure 13 montre qu'il faut atteindre une concentration de 15 mUI/ml de LH sérique pour voir une augmentation notable de la LH urinaire. Une ovulation prématurée ne peut être identifiée de manière précoce. L'utilisation d'un seuil urinaire de 5 mUI/mg créatinine n'est pas satisfaisante dans le contexte de la PMA.

Notons par ailleurs qu'il peut y avoir un décalage entre l'augmentation sérique et l'augmentation urinaire (41)(6) or tous les dosages urinaires sont fait en parallèle du sérum. Une augmentation sérique non vu sur ce dosage aurait pu l'être le lendemain.

Identifier la période fertile est l'enjeu de tests disponibles en officine (42). Des analyses réalisées en laboratoire confrontent ces résultats hormonaux et des échographies endovaginales pour étudier l'application en routine des dosages urinaires. Les résultats sont en faveur d'une très bonne concordance entre sang et urine (41)(31). La LH et l'estrone-glucuronide sont les hormones de choix pour définir les jours de forte probabilité de conception. Notre travail ne donne pas de résultats aussi concluants. Plusieurs raisons pourraient expliquer cette discordance. Premièrement, ces études sont réalisées sur une population de femme ne présentant aucun trouble de la fertilité. Deuxièmement ces articles sont basés sur des dosages quotidiens sur toute la durée d'un cycle alors que nous ne disposons souvent que de 3 dosages par cycle. Troisièmement, les protocoles utilisés permettent un meilleur contrôle de la qualité du prélèvement et l'analyse peut être faite directement après le prélèvement urinaire. Enfin, l'estrogène dosé est l'estrone glucuronide et il s'agit de test qualitatif et non quantitatif.

CONCLUSION

Mise en place et Evaluation des dosages sériques de l'œstradiol, de la progestérone et de l'hormone lutéinisante sur l'analyseur Dimension Vista (Siemens).

Application aux dosages urinaires de l'œstradiol et de l'hormone lutéinisante chez la femme au cours de l'aide médicale pour la procréation

Conclusion

Les méthodes des dosages de l'œstradiol, de l'hormone lutéinisante et de la progestérone sont réalisées sur deux analyseurs Dimension Vista. Elles exploitent la technologie LOCI™. Elles remplacent les méthodes CMIA™ du Centaur XP et du Centaur CP.

Le laboratoire ayant inscrit ces trois examens dans sa demande d'extension de l'accréditation en 2015, nous avons rédigé les documents de vérification de méthode conformément aux exigences de la norme ISO NF EN 15189.

Les différents paramètres de fiabilité (répétabilité, fidélité intermédiaire, justesse et exactitude) sont conformes aux critères d'acceptabilité établis par les sociétés savantes. Les différentes approches utilisées pour calculer les incertitudes de mesure ont abouti à des résultats comparables et acceptables sur le plan clinique. Il n'est cependant pas encore possible de définir la méthode la plus appropriée et la plus représentative de la variabilité de nos résultats.

La comparaison des méthodes a été menée à 2 niveaux : d'une part entre les 2 méthodes et d'autre part entre les 2 analyseurs utilisant la même méthode.

Les méthodes appliquées sur les analyseurs Vista sont plus précises à l'exception des valeurs basses d'œstradiol pour lesquelles les CV sont comparables à ceux du Centaur XP. Les concentrations de LH sont comparables quelle que soit la méthode. Les analyseurs Vista donnent des résultats d'œstradiol plus bas d'environ 20 % et des résultats de progestérone plus hauts d'environ 10 %. Ces écarts n'ont pas de conséquences sur la prise en charge des patientes dans ce contexte. Les limites de détections ne sont pas différentes et les gammes de dosages sont plus étroites avec cette nouvelle méthode.

Les deux automates Vista utilisés en miroir sont équivalents sauf pour les valeurs basses d'œstradiolémie. La corrélation entre les résultats des deux Vista est bien meilleure que celle qui était observée entre le Centaur XP et le Centaur CP utilisé en cas de panne du Centaur XP.

L'analyse de risque sur le processus analytique ne met pas en évidence d'éléments dont la fréquence ou la gravité justifierait la mise en place d'un plan d'action. La criticité la plus élevée concerne la panne simultanée et prolongée des 2 analyseurs pour laquelle une solution de repli peut être organisée avec un autre laboratoire.

Le changement de méthodes a amélioré l'organisation de la plateforme commune de biochimie et permet de ne plus avoir à maintenir le Centaur CP. La médiane des délais de rendu n'a pas changé et les bilans rendus après 11 heures sont moins nombreux. De plus, les retards de rendu des résultats par rapport aux besoins du service sont moins importants.

Cette analyse réalisée sur les 3 premiers mois suivant le transfert de méthode devra être renouvelé à distance pour confirmer ces observations. Cependant plusieurs points sont à améliorer : les retards, leurs causes et leurs signalements doivent être mieux tracés. Un nouvel outil informatique devrait nous aider à corriger ces points.

Les dosages urinaires d'estradiol et de LH ne sont pas satisfaisants et ne peuvent être appliqués au suivi des femmes au cours de la PMA. Les concentrations urinaires ne sont pas corrélées aux valeurs sériques. L'estradiol n'est pas un bon marqueur de la croissance folliculaire ni du blocage de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Il n'est pas possible de définir une valeur seuil d'estradiolurie pour déclencher une ovulation. De plus, la LH urinaire ne dépiste pas de manière fiable et précoce une augmentation de la concentration de LH sérique. Un dosage quotidien, au moins, à partir du 6^{ème} jour du cycle permettrait d'augmenter la sensibilité de la méthode mais serait trop contraignant pour les patientes.

Le 24/09/13

Le Président du jury
Pr Patrice Faure



Département de Biochimie,
Toxicologie et Pharmacologie
Responsable Pr Patrice FAURE
Pôle de Biologie - CHU de Grenoble
CS 10217 - 38043 GRENOBLE CEDEX 9
Tel. 04 76 76 54 84 - Tel. 04 76 76 56 64

BIBLIOGRAPHIE

1. Michael Grynberg. Assistance médicale à la procréation, dossier d'information de l'Inserm. <http://www.inserm.fr/thematiques/biologie-cellulaire-developpement-et-evolution/dossiers-d-information/assistance-medecine-a-la-procreation>. 2013.
2. A.Ohannessian, M.Gamerre, A.Agostini. Épidémiologie de la fertilité. EMC-Gynecologie. 2014;9(2):1–8.
3. Rapport médical et scientifique de l'agence de la biomédecine : rapport d'activité annuel d'AMP. [Internet]. 2012. Available from: <http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2013/donnees/procreation/01-amp/pdf/amp.pdf>
4. J. Taieb, C. Benattar, C. Poüs. Les dosages hormonaux dans la prise en charge et le monitoring des cycles d'assistance médicale à la procréation : intérêt et difficultés de réalisation. Ann Biol Clin. 2003;(61):533–40.
5. Steele, PA, McDonnell, LF, Judd SJ. Activity of gonadotropin-releasing hormone neurons during the preovulatory luteinizing hormone surge. Fertil Steril. 1986;2(45):179–84.
6. E.Gratius. Intérêt de l'apport de LH au cours des Fécondations In Vitro, Etude rétrospective et mise en place d'une étude prospective. UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1; 2011.
7. Stanczyk FZ, Archer DF, Bhavnani BR. Ethinyl estradiol and 17 β -estradiol in combined oral contraceptives: pharmacokinetics, pharmacodynamics and risk assessment. Contraception. 2013 Jun;87(6):706–27.
8. Mattison DR, Karyakina N, Goodman M, LaKind JS. Pharmacokinetics and toxicokinetics of selected exogenous and endogenous estrogens: A review of the data and identification of knowledge gaps. Crit Rev Toxicol. 2014 Sep;44(8):696–724.
9. J.Taieb, M.Lachgar-Keltoum. La progestérone : caractéristiques immunoanalytiques. immuno-analyse et biologie spécialisée. 2011;26:182–9.
10. Taïeb J, Sarnel C, Benattar C, Lindenbaum A. Une nouvelle technique de dosage du 17 β -estradiol sur le Kryptor® (Cis-Bio international) : utilisation au cours des cycles stimulés. Ann Biol Clin (Paris). 2000 Feb 7;58(1):71–9.
11. biomnis. Estradiol. In: Précis de biopathologie, analyse médicale spécialisé. 2012.
12. Adlercreutz H, Brown J, Collins W, Goebelsman U, Kellie A, Campbell H, et al. The measurement of urinary steroid glucuronides as indices of the fertile period in women. World Health Organization, Task Force on Methods for the Determination of the Fertile Period, special programme of research, development and research training in human reproduction. J Steroid Biochem. 1982 Dec;17(6):695–702.
13. Branch CM, Collins PO, Collins WP. Ovulation prediction: changes in the concentrations of urinary estrone-3-glucuronide, estradiol-17 beta-glucuronide and estriol-16 alpha-glucuronide during conceptional cycles. J Steroid Biochem. 1982 Feb;16(2):345–7.
14. M. Gröschl. Données actuelles sur l'analyse hormonale salivaire. Ann Biol Clin. 2009;67(5):493–504.
15. Compte rendu de ProBioQual. Sérum 15MD01 et 15MD02. Janvier et Février 2015.

16. Ullman EF, Kirakossian H, Switchenko AC, Ishkanian J, Ericson M, Wartchow CA, et al. Luminescent oxygen channeling assay (LOCI): sensitive, broadly applicable homogeneous immunoassay method. *Clin Chem*. 1996;42(9):1518–26.
17. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999;59(7):491–500.
18. Lachgar M, Moulin G, Taieb J. Un nouveau dosage de l'estradiol pour l'Advia-Centaur (Siemens): Performances analytiques et cliniques. [cited 2015 Aug 30]; Available from: http://www.researchgate.net/profile/Joelle_Taieb/publication/253234650_ABC_eE2_Centaur_Taieb_Joelle/links/0c96051f668899c074000000.pdf
19. GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION DE VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) DES METHODES EN BIOLOGIE MEDICALE Document SH GTA 04 Révision 01.
20. Fiche technique Siemens : Dosages de l'Estradiol par la technique LOCI. référence K6463. septembre 2011.
21. GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION POUR L'EVALUATION DES INCERTITUDES DE MESURE EN BIOLOGIE MEDICALE SH GTA 14 Révision 00.
22. Giroud C, Dumontet M, Vassault A, Braconnier F, Férard G. Recommandations relatives à l'expression de l'incertitude de mesure des résultats quantitatifs en biologie médicale (Document F). In: *Annales de Biologie Clinique* [Internet]. 2007 [cited 2015 Sep 24]. p. 185–200. Available from: http://www.jle.com/fr/revues/abc/e-docs/recommandations_relatives_a_lexpression_de_lincertitude_de_mesure_des_resultats_quantitatifs_en_biologie_medicale_document_f_273457/article.phtml
23. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. INTERNATIONAL STANDARD ISO/FDIS 13528. 2005.
24. A. Vassault, D. Grafmeyer, Graeve J de, R. Cohen, A. Beaudonnet, J. Bienvenu. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. *Annales de Biologie Clinique*. 1999;57(6).
25. Fiche technique de Siemens : Dosage de la LH avec l'automate ADVIA Centaur. 10629882_FR Rev. M, 2011-06.
26. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation. Updated for 2014. www.westgard.com/biodatabase1.htm.
27. Delvigne A, Rozenberg S. Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a review. *Hum Reprod Update*. 2002;8(6):559–77.
28. Leiva R, Bouchard T, Boehringer H, Abulla S, Ecochard R. Random serum progesterone threshold to confirm ovulation. *Steroids*. 2015 Sep;101:125–9.
29. MILLET Sylvain. Mise en place d'une exigence de la norme NF EN ISO 15189 : indicateurs qualité et gestion des non-conformités sur la Plateforme Commune de Biologie du CHU de Grenoble. Thèse pour le Diplôme d'état de docteur en Pharmacie. 2013.
30. S.Salama, A.Torre, B.Paillusson, A.Thomin, F. Ben Brahim, C. Muratorio, et al. Le monitoring de l'ovulation, passé, présent et perspectives. 2011;(39):245–54.

31. Behre H., Kuhlage J, Gabner C, Sonntag B, Schem, Schneider HP., et al. Prediction of ovulation by urinary hormone measurements with the home use of ClearPlan Fertility Monitor: comparison with transvaginal ultrasound scans and serum hormone measurements. *Human Reproduction*; 2000.
32. Liu Z, Kanjo Y, Mizutani S. Urinary excretion rates of natural estrogens and androgens from humans, and their occurrence and fate in the environment: A review. *Sci Total Environ*. 2009 Sep;407(18):4975–85.
33. Matthews CE, Fortner RT, Xu X, Hankinson SE, Eliassen AH, Ziegler RG. Association between Physical Activity and Urinary Estrogens and Estrogen Metabolites in Premenopausal Women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Oct;97(10):3724–33.
34. Fuhrman BJ, Pfeiffer RM, Wu AH, Xu X, Keefer LK, Veenstra TD, et al. Green tea intake is associated with urinary estrogen profiles in Japanese-American women. *Nutr J*. 2013;12(1):25.
35. Park SJ, Goldsmith LT, Skurnick JH, Wojtczuk A, Weiss G. Characteristics of the urinary luteinizing hormone surge in young ovulatory women. *Fertil Steril*. 2007 Sep;88(3):684–90.
36. Blackwell LF, Vigil P, Cooke DG, d' Arcangues C, Brown JB. Monitoring of ovarian activity by daily measurement of urinary excretion rates of oestrone glucuronide and pregnanediol glucuronide using the Ovarian Monitor, Part III: Variability of normal menstrual cycle profiles. *Hum Reprod*. 2013 Dec 1;28(12):3306–15.
37. Eichner SF, Timpe EM. Urinary-based ovulation and pregnancy: point-of-care testing. *Ann Pharmacother*. 2004 Feb;38(2):325–31.
38. Liu Z, Lu G, Yin H, Dang Z, Littier H, Liu Y. Sample-preparation methods for direct and indirect analysis of natural estrogens. *TrAC Trends Anal Chem*. 2015 Jan;64:149–64.
39. Ecochard R, Leiva R, Bouchard T, Boehringer H, Direito A, Mariani A, et al. Use of urinary pregnanediol 3-glucuronide to confirm ovulation. *Steroids*. 2013 Oct;78(10):1035–40.
40. Seki K, Seki M, Kato K. Correlation between urinary oestrogen levels determined by haemagglutination inhibition reaction and serum oestradiol levels determined by radioimmunoassay. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1985 Sep;110(1):130–4.
41. Roos J, Johnson S, Weddell S, Godehardt E, Schiffner J, Freundl G, et al. Monitoring the menstrual cycle: Comparison of urinary and serum reproductive hormones referenced to true ovulation. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 2015 May 27;1–13.
42. Tests d'ovulation Clearblue [Internet]. [cited 2015 Jul 30]. Available from: <http://fr.clearblue.com/tests-ovulation-fertilite>

ANNEXES

Annexe 1 : convention clinico-biologique signée entre le DBTP et le service de PMA

service de PMA

Convention entre le Département de Biochimie-Toxicologie/Pharmacologie (DBTP) et le Service de Médecine de la Procréation.

L'activité du service clinique nécessite que les résultats des dosages de LH, œstradiol et progestérone dans le cadre des bilans de fécondation in vitro soient communiqués au Service de Médecine de la Procréation du lundi au samedi avant 11h00.

Chaque fois que des résultats ne peuvent pas être rendus dans le délai fixé, le laboratoire avertit le Service de Médecine de la Procréation dès que le retard est prévisible et au plus tard à 10h45.

Les indicateurs de suivi sont :

1 - le pourcentage de résultats d'œstradiol envoyés vers le serveur de résultats après 11h00. Cet indicateur est obtenu par extraction de l'heure de validation biologique à partir du SIL.

2 - le pourcentage de demandes arrivées au laboratoire après 9h15. Cet indicateur est obtenu par extraction de l'heure d'enregistrement dans le SIL.

Ces indicateurs sont communiqués mensuellement au Service de Médecine de la Procréation. Les retards sont analysés en détail par le laboratoire pour identifier les points de dysfonctionnement. Les effets des actions correctives sont évalués par le suivi de l'indicateur.

Les contractants s'engagent à respecter sauf cas de force majeure les règles suivantes :

- Service de Médecine de la Procréation :
 - o envoyer des prélèvements selon la procédure en vigueur pour les demandes prioritaires (pochette transparente avec un papier de couleur).
 - o les prélèvements doivent parvenir au laboratoire avant 9h15
 - o renseigner l'heure de prélèvement

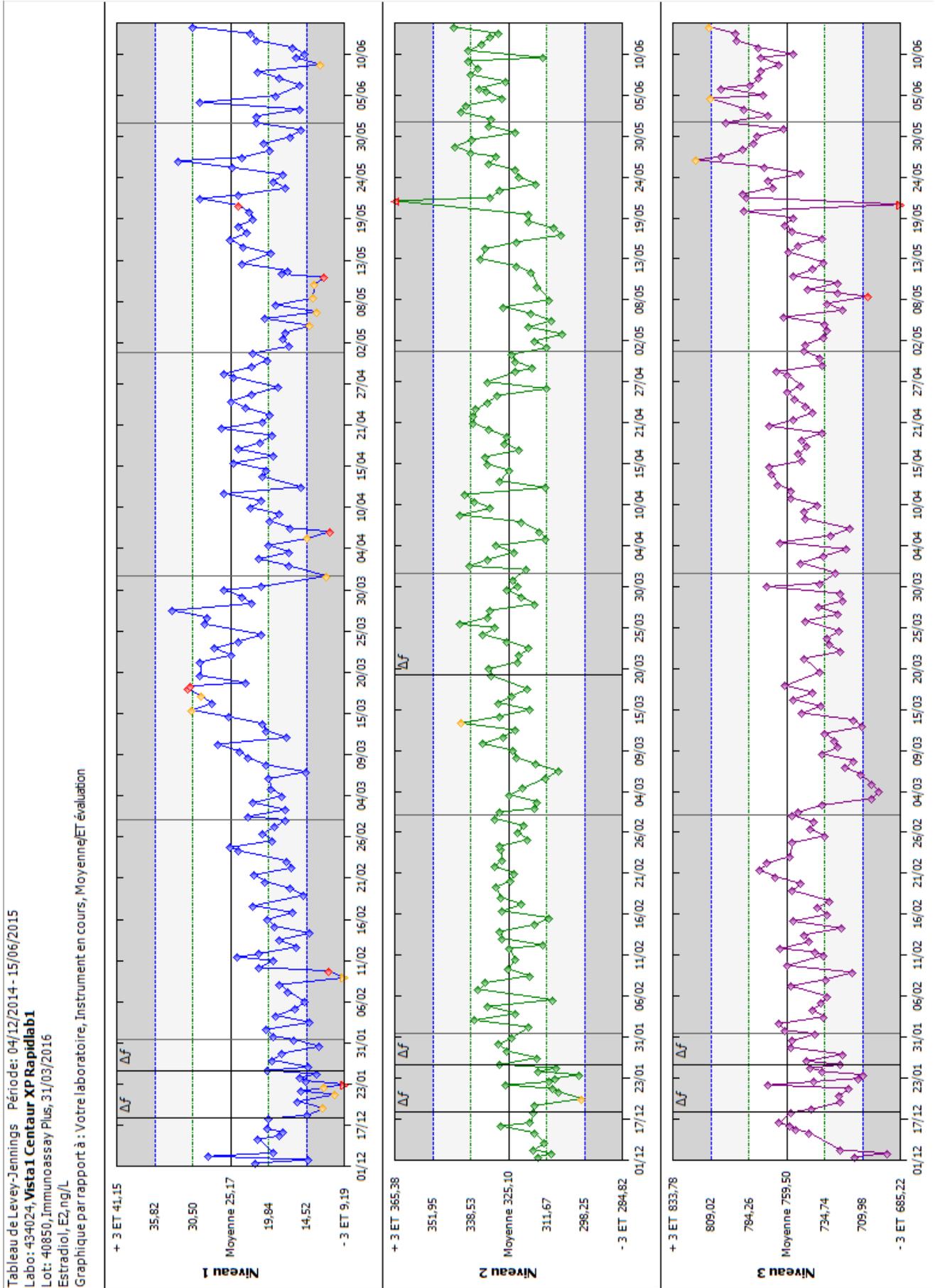
- Laboratoire de biologie médicale :
 - o tracer en temps réel le traitement des échantillons depuis l'arrivée au laboratoire jusqu'à la validation biologique.
 - o Communiquer au prescripteur des statistiques mensuelles précisant les pourcentages de demandes pour lesquelles les objectifs d'heure d'arrivée au laboratoire et d'heure de rendu de résultats ont été respectés.
 - o Analyser les causes de retard
 - o proposer des actions correctives et évaluer ces actions au moyen des indicateurs, en concertation avec les cliniciens.
 - o prévenir le service en cas de dysfonctionnements engendrant un retard de rendu de résultats.
 - o En cas de panne d'analyseur, avertir par téléphone le Service de Médecine de la Procréation et mettre immédiatement en œuvre les procédures adaptées : changement d'analyseur puis si nécessaire externalisation des examens selon convention.
 - o Autoriser l'ajout du dosage de β -HCG à une demande en cours, par appel téléphonique du prescripteur en cas de suspicion de grossesse.

Tel laboratoire : 66398 / 65222

Tel service PMA : 60395 / 65331

Annexe 2 : Carte de contrôle des CIQ pour l'estradiol obtenus pour le Vista 1

Estradiol VISTA 1



Annexe 3 : lettre d'information aux patientes et protocole de dosages

	Laboratoire de Biologie Médicale Plateforme Commune de Biochimie Toxicologie Pharmacologie
	ETUDE DE FAISABILITE : remplacer le dosage sanguin de LH et estradiol par un dosage urinaire, Fiche d'information aux patientes
Date de début : mars 2015	Responsable du projet : Hadrien Maguet, interne Encadrant : Pr Hoffmann Pascale, gynéco-obstétricien

Pour réduire les contraintes liées aux dosages hormonaux dans le cadre de l'assistance à la procréation, nous étudions la possibilité de remplacer les dosages sanguins par des dosages urinaires, Le but serait de ne plus faire de prises de sang répétées,

Nous vous sollicitons dans le cadre de la mise au point éventuelle des dosages urinaires, Si vous souhaitez contribuer à cette étude, il vous sera demandé **de recueillir les urines du matin** le jour de votre rendez-vous dans le service d'AMP en respectant les recommandations suivantes :

Dans le flacon à bouchon rouge qui vous a été remis par un membre de l'équipe :

- Recueillir les urines en milieu de miction
- Seul un échantillon d'urine est nécessaire (Remplir un peu plus de la moitié du pot)
- Veiller à bien visser le bouchon

Mettre le flacon dans le sac qui vous a été remis en même temps que le flacon

- Attention : mettre le flacon dans la poche principale
- Retirer l'autocollant bleu
- fermer le sac en rapprochant les deux bords

Apporter l'ensemble aux sages-femmes lors de votre prise de sang,

Ceci nous permettra de comparer vos dosages sanguins habituels aux résultats obtenus par les dosages urinaires, dans le cadre de cette recherche préliminaire, Votre prise en charge sera faite par l'équipe d'AMP de façon habituelle, Les dosages urinaires n'entrent pas en compte,

Vous êtes bien entendu entièrement libre de ne pas participer ou d'interrompre votre participation à tout moment : cela n'aura aucune incidence sur votre prise en charge.

Pour plus de précisions, vous pouvez contacter, via mail, le responsable du travail :

hmaguet@chu-grenoble.fr ou 04 76 76 62 05

Merci d'avoir pris le temps de lire cette information et de votre contribution à ce travail

Hadrien Maguet, Interne de biologie médicale
Service de biochimie

Pr P. Hoffmann
Centre d'AMP



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

Mise en place et Evaluation des dosages sériques de l'estradiol, de la progestérone et de l'hormone lutéinisante sur l'analyseur Dimension Vista (Siemens).
Application aux dosages urinaires de l'estradiol et de l'hormone lutéinisante chez la femme au cours de l'aide médicale pour la procréation

Hadrien MAGUET

RESUME

Pour optimiser l'organisation du travail sur la plateforme commune de biochimie du laboratoire du CHU de Grenoble nous avons transféré le dosage sérique des hormones estradiol, progestérone et hormone lutéinisante (LH) depuis l'analyseur Advia Centaur XP (technique CMIA™) vers le Dimension VISTA 1500 (technique LOCI™). Nous avons évalué les performances analytiques des nouvelles méthodes et comparé les résultats de chaque analyseur. Ces derniers ont été confrontés aux limites d'acceptabilité établies par la Société Française de Biologie Clinique et par les travaux de Carmen Ricos. Pour l'accréditation de ces analyses, nous avons rédigé les documents de vérification de méthode (SH FORM 43) exigés par le COFRAC suivant la norme ISO NF EN 15189. Nous avons évalué notre délai de rendu et vérifié que notre engagement à rendre les résultats avant 11 heures du matin était tenu. Enfin, nous avons étudié la possibilité de substituer les dosages sériques d'estradiol et de LH par des dosages urinaires pour le suivi des femmes au cours des cycles de PMA

Les performances de répétabilité, de fidélité intermédiaire sont meilleures avec l'analyseur Vista. Les méthodes sont équivalentes pour la LH. Les résultats d'estradiol sont en moyenne 20 % plus bas et ceux de la progestérone 10% plus haut avec l'analyseur Vista. Le transfert a amélioré l'organisation de la plateforme commune de biochimie. La nouvelle organisation n'a pas modifiée le délai de rendu et le nombre de bilan rendu après 11 heures a été réduit. L'urine ne peut pas être utilisée pour le suivi des patientes. Il n'y a pas de corrélation entre les résultats sériques et urinaires et l'estradiolurie n'est pas stable.

Mots-Clés : Procréation médicalement assistée – Biologie Médicale - Dosages sériques – Dosages Urinaires – Estradiol – Progestérone – Hormone Lutéinisante – Accréditation

Set up and evaluation of serum assays of estradiol, progesterone and luteinizing hormone on the analyzer Dimension Vista (Siemens)

Application to urinary assays of estradiol and luteinizing hormone in women during medically assisted procreation

SUMMARY

In order to enhance the organization of the biochemistry laboratory of Grenoble University Hospital Center we set new automated assay of estradiol, progesterone and luteinizing hormone (LH) in serum using the Dimension Vista 1500 which were previously analyzed by the Advia Centaur XP. The analytical performances of these new methods were compared to the reference values established by the French Society of Clinical Biology and data base of *Carmen Ricos and col.* Correlation between the two analyzers were evaluated. We wrote certification documents (SH FORM 43) for these assays according to the norm ISO NF EN 15189. Moreover, the impact of the new method on the turnaround time was evaluated. Besides, we use different way to evaluate the uncertainty of measurement. In addition, we studied the feasibility of urinary dosage of estradiol and LH to monitor women during medically assisted procreation.

Imprecision (within and between run) is better with Vista analyzer. There are no difference between LH result. They are on average 20% lower for estradiol and 10% higher for progesterone. The new methods have improved the organization of the common platform of biochemistry. No changes in the turnaround time have been identified. The results of the urine tests showed that the urine is not a reliable matrix for the monitoring of patients in the context of medically assisted procreation.

Key words : Medically assisted procreation – Laboratory medicine – serum assays – urinary assays – Estradiol – Progesterone – Luteinizing hormone - Accreditation